BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Đình Hợp

XÂY DỰNG MÔ HÌNH TIÊN LƯỢNG KẾT QUẢ CHUYỂN PHÔI DỰA VÀO EEVA VÀ MỘT SỐ THÔNG SỐ ĐỘNG HỌC HÌNH THÁI PHÔI NANG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Vũ Đình Hợp

XÂY DỰNG MÔ HÌNH TIÊN LƯỢNG KẾT QUẢ CHUYỂN PHÔI DỰA VÀO EEVA VÀ MỘT SỐ THÔNG SỐ ĐỘNG HỌC HÌNH THÁI PHÔI NANG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ	Người hướng dẫn 1 *(Ký, ghi rõ họ tên)*	Người hướng dẫn 2 *(Ký, ghi rõ họ tên)*
	PGS.TS.BS. Lê Hoàng	TS. Nguyễn Văn Hạnh

Hà Nội - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: ***"Xây dựng mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi dựa vào EEVA và một số thông số động học hình thái phôi nang"*** là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 06 tháng 11 năm 2026

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Vũ Đình Hợp

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới quý thầy cô, bạn bè, gia đình, đồng nghiệp và các cơ quan đã hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu:

- Trước hết, tôi xin trân trọng cảm ơn hai thầy hướng dẫn, PGS.TS.BS. Lê Hoàng và TS. Nguyễn Văn Hạnh, những người đã tận tình chỉ bảo, định hướng khoa học, khích lệ, giúp đỡ và đồng hành cùng tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

- Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS.BS. Nguyễn Thị Liên Hương, Phó Giám đốc Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Trưởng phòng Lab IVF, người đã gợi ý và định hướng đề tài nghiên cứu, tạo nền tảng quan trọng cho luận án, đồng thời luôn đồng hành, góp ý và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình triển khai nghiên cứu.

- Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Trung tâm Hỗ trợ sinh sản và Ban Lãnh đạo Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh đã tạo điều kiện thuận lợi, hỗ trợ kinh phí đào tạo và cho phép tôi sử dụng số liệu để thực hiện luận án.

- Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ, cùng Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi để tôi học tập, nghiên cứu, hoàn thành chương trình đào tạo và luận án.

- Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, đặc biệt là tập thể đồng nghiệp phòng Lab IVF Tâm Anh, đã luôn hỗ trợ trong công việc, chia sẻ kinh nghiệm và động viên tôi trong suốt quá trình nghiên cứu.

- Tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc tới gia đình hai bên, đặc biệt là bố mẹ, những người luôn là chỗ dựa vững chắc, động viên và hỗ trợ tôi về mọi mặt trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

- Sau cùng, tôi xin dành lời cảm ơn sâu sắc tới vợ và các con của tôi, những người luôn ở bên, chia sẻ, động viên và là nguồn động lực to lớn giúp tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 06 tháng 11 năm 2026

Tác giả luận án

Vũ Đình Hợp

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN
LỜI CẢM ƠN
DANH MỤC THUẬT NGỮ VÀ CÁC TỪ VIẾT TẮT i
DANH MỤC BẢNG ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ iv
MỞ ĐẦU 1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 4
1.1. Sự phát triển của phôi người tiền làm tổ 4
1.1.1. Giai đoạn hợp tử 4
1.1.2. Giai đoạn phôi phân chia 4
1.1.3. Giai đoạn phôi dâu 6
1.1.4. Giai đoạn phôi nang 6
1.2. Đánh giá hình thái phôi 8
1.2.1. Đánh giá thụ tinh 8
1.2.2. Đánh giá phôi phân chia 9
1.2.3. Đánh giá phôi dâu 12
1.2.4. Đánh giá phôi nang 13
1.3. Các phương pháp đánh giá lựa chọn phôi khác 16
1.3.1. Đánh giá phôi bằng xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (PGT) 16
1.3.2. Đánh giá phôi sử dụng dấu hiệu sinh học của phôi (Embryo biomarker) 17
1.4. Hệ thống nuôi cấy phôi sử dụng công nghệ theo dõi phôi time-lapse 18
1.4.1. Giới thiệu chung 18
1.4.2. Hệ thống nuôi cấy phôi time-lapse GERI 20
1.5. Đánh giá chất lượng phôi bằng hệ thống time-lapse 21
1.5.1. Đặc điểm hình thái phôi quan sát qua hệ thống time-lapse 21
1.5.2. Động học hình thái phôi 25
1.6. Hệ thống phần mềm đánh giá phôi tích hợp trong hệ thống time-lapse 28
1.6.1. Ứng dụng các mô hình phần mềm đánh giá phôi 28
1.6.2. Hệ thống phần mềm đánh giá khả năng sống của phôi ở giai đoạn sớm (Early Embryo Viability Assessment system - EEVA) 29
1.6.3. Phần mềm đánh giá phôi khác được tích hợp vào tủ nuôi cấy time-lapse 31
1.7. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên phần mềm đánh giá phôi, đặc điểm về động học hình thái, và sự kết hợp của các đặc điểm này 32
1.7.1. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên các đặc điểm động học 32
1.7.2. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên sự kết hợp phần mềm đánh giá phôi, thông số động học, hình thái. 38
1.7.3. Các nghiên cứu tại Việt Nam 40
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 42

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu **42**
2.1.1. Địa điểm nghiên cứu **42**
2.1.2. Thời gian nghiên cứu **42**
2.2. Đối tượng nghiên cứu **42**
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu **42**
2.2.2. Tiêu chuẩn lựa chọn **42**
2.2.3. Tiêu chuẩn loại trừ **43**
2.3. Thiết kế nghiên cứu **43**
2.4. Phương pháp chọn mẫu **44**
2.5. Phương pháp xác định cỡ mẫu **45**
2.5.1. Cỡ mẫu tối thiểu cho các phân tích mô tả bổ sung **45**
2.5.2. Cỡ mẫu chính của luận án **45**
2.6. Biến số và chỉ số nghiên cứu **46**
2.7. Phương pháp thu thập và quản lý số liệu **48**
2.7.1. Nguồn dữ liệu và công cụ thu thập số liệu **48**
2.7.2. Quy trình thu thập số liệu **48**
2.7.3. Quản lý số liệu **49**
2.8. Phương pháp kiểm soát sai số và đảm bảo chất lượng số liệu **49**
2.9. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu **50**
2.9.1. Phần mềm và nguyên tắc phân tích số liệu **50**
2.9.2. Kế hoạch phân tích số liệu **50**
2.10. Quy trình tại phòng Lab IVF **54**
2.10.1. Xử lý noãn, tinh trùng **54**
2.10.2. Nuôi cấy phôi tủ GERI plus có tích hợp phần mềm đánh giá phôi EEVA **54**
2.10.3. Đánh giá và phân độ phôi theo hình thái **55**
2.10.4. Đánh giá phôi theo hệ thống EEVA phiên bản 3.1 tại trung tâm **56**
2.10.5. Bảo quản lạnh sâu và phục hồi sau bảo quản **58**
2.10.6. Nuôi cấy phôi sau khi rã đông, quy trình chuyển phôi nang đông lạnh và hỗ trợ hoàng thể **58**
2.11. Khía cạnh đạo đức của nghiên cứu: **59**
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN **60**
3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu **60**
3.1.1. Đặc điểm chu kỳ kích thích buồng trứng và tạo phôi **60**
3.1.2. Đặc điểm nền của bệnh nhân trong các chu kỳ chuyển phôi **62**
3.1.3. Đặc điểm phôi nang được chuyển **64**
3.2. Kết quả đánh giá phôi theo phần mềm EEVA **66**
3.2.1. Phân bố các nhóm EEVA và mối liên quan với chất lượng phôi nang **67**
3.2.2. Giá trị tiên lượng của phần mềm EEVA với chất lượng phôi nang **71**
3.3. Kết quả mối liên quan giữa các thông số động học và chất lượng hình thái của phôi nang **78**

3.4. Kết quả thai kỳ sau chuyển một phôi nang chu kỳ rã đông 85
3.4.1. Đặc điểm lâm sàng của chu kỳ chuyển phôi giữa hai nhóm kết quả thai **85**
3.4.2. Mối liên quan giữa chất lượng hình thái phôi và kết quả thai **87**
3.4.3. Mối liên quan giữa EEVA và kết quả thai **90**
3.4.4. Mối liên quan giữa các thông số động học và kết quả thai **92**
3.4.5. Giá trị tiên lượng của đánh giá hình thái, phần mềm EEVA, động học với kết quả làm tổ **94**
3.5. Xây dựng và đánh giá mô hình tiên lượng kết quả làm tổ của phôi 100
3.5.1. Xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi **101**
3.5.2. So sánh hiệu quả và lựa chọn mô hình **105**
3.5.3. Nội kiểm mô hình xây dựng được chọn (Mô hình 4-mô hình kết hợp EEVA và hình thái) **108**
3.5.4. Biểu đồ nomogram dự đoán xác suất làm tổ sau chuyển một phôi nang đông lạnh - rã đông của mô hình được chọn. **111**
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 120
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 122
TÀI LIỆU THAM KHẢO 123

DANH MỤC THUẬT NGỮ VÀ CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AFC	Antral Follicle Count	Số nang thứ cấp
AI	Artificial Intelligence	Trí tuệ nhân tạo
AMH	Anti-Mullerian Hormone	Hormone dự trữ buồng trứng
AUC	Area Under the Curve	Diện tích dưới đường cong
ASRM	American Society for Reproductive Medicine	Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ
BL	Blastocyst Expansion	Độ nở phôi nang
BMI	Body Mass Index	Chỉ số khối cơ thể
CI	Confidence Interval	Khoảng tin cậy
COC	Cumulus-oocyte Complex	Phức hợp gồm noãn và các tế bào hạt
EEVA	Early Embryo Viability Assessment	Phần mềm đánh giá khả năng sống của phôi dựa vào giai đoạn sớm
GEE	Generalized Estimating Equations	Phương trình ước lượng tổng quát
GERI	Genea Embryo Review Incubator	Tủ nuôi cấy time-lapse GERI
ICM	Inner Cell Mass	Tế bào nội phôi
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	Tiêm tinh trùng vào bào tương noãn
IQR	Interquartile Range	Khoảng tứ phân vị
IVF	In Vitro Fertilization	Thụ tinh trong ống nghiệm
Lab	Laboratory	Phòng thí nghiệm IVF
NMTC	Endometrium	Niêm mạc tử cung
NST	Chromosome	Nhiễm sắc thể
OR	Odds ratio	Tỉ số chênh
PGT	Preimplantation Genetic Testing	Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ
PN	Pronuclear	Tiền nhân
ROC	Receiver Operating Characteristic	Đường cong ROC
SD	Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
TE	Trophectoderm	Tế bào lá nuôi
VIF	Variance Inflation Factor	Hệ số phóng đại phương sai
ZP	Zona Pellucida	Màng trong suốt

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Đặc điểm các hệ thống nuôi cấy time-lapse thương mại hiện nay.....20
Bảng 1.2. Các mốc thời gian sự kiện động học hình thái và định nghĩa [4] 27
Bảng 1.3. Khoảng thời gian giữa các sự kiện động học và định nghĩa [4] 27
Bảng 1.4. Một số nghiên cứu về thuật toán dự báo tỷ lệ làm tổ dựa trên thông số động học hình thái.....33
Bảng 2.1. Mô tả các biến số trong nghiên cứu 46
Bảng 2.2. Thời điểm đánh giá thụ tinh và phân loại phôi từng giai đoạn 55
Bảng 2.3. Phân loại hình thái phôi ngày 3 theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha 56
Bảng 2.4. Phân loại chất lượng phôi nang theo hình thái.....56
Bảng 3.1. Đặc điểm chung về mô tả và nhân khẩu học của bệnh nhân thực hiện phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) 60
Bảng 3.2. Đặc điểm bệnh nhân trong các chu kỳ chuyển phôi 62
Bảng 3.3. Đặc điểm phôi trong các chu kỳ chuyển phôi.....64
Bảng 3.4. Tỷ lệ hình thành phôi nang theo điểm EEVA.....67
Bảng 3.5. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và khả năng hình thành phôi nang.....71
Bảng 3.6. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và khả năng hình thành phôi nang có phân độ rất tốt và tốt.....73
Bảng 3.7. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và chất lượng hình thái ICM (ICM loại A và ICM loại C).....74
Bảng 3.8. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và chất lượng hình thái TE (TE loại A và TE loại C).....75
Bảng 3.9. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và mức độ giãn nở của phôi nang (BL>2).....76
Bảng 3.10. Mối liên quan giữa các thông số động học và phân độ hình thái phôi.....79
Bảng 3.11. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái ICM.....80
Bảng 3.12. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái TE.....81
Bảng 3.13. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái độ nở phôi 82
Bảng 3.14. Đặc điểm lâm sàng của chu kỳ chuyển phôi giữa hai nhóm.....85
Bảng 3.15. Mối liên quan giữa phân độ phôi và kết quả làm tổ, thai diễn tiến.....87
Bảng 3.16. Mối liên quan giữa hình thái ICM và kết quả làm tổ, thai diễn tiến.....87
Bảng 3.17. Mối liên quan giữa hình thái TE và kết quả làm tổ, thai diễn tiến.....88
Bảng 3.18. Mối liên quan giữa hình thái độ nở và kết quả làm tổ, thai diễn tiến 88
Bảng 3.19. Mối liên quan giữa điểm EEVA và kết quả làm tổ, thai diễn tiến.....90
Bảng 3.20. Các thông số động học hình thái của phôi làm tổ và phôi không làm tổ; của phôi thai kỳ diễn tiến và phôi thai kỳ không diễn tiến.....92
Bảng 3.21. Phân tích đơn biến các yếu tố liên quan đến khả năng làm tổ 95
Bảng 3.22. Phân tích đơn biến các yếu tố liên quan đến kết quả thai diễn tiến 96

Bảng 3.23. Kiểm tra đa cộng tuyến giữa các biến động học của phôi nang.....97
Bảng 3.24. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa hình thái với kết quả làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi 101
Bảng 3.25. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa điểm EEVA với kết quả làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi 101
Bảng 3.26. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa điểm các thông số động học với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi.....102
Bảng 3.27. Mô hình GEE đánh giá giá trị cộng hưởng khi kết hợp EEVA với hình thái phôi đối với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ, tuổi phôi 103
Bảng 3.28. Mô hình GEE đánh giá giá trị cộng hưởng khi kết hợp EEVA, hình thái phôi nang và các thông số động học đối với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ, tuổi phôi 104
Bảng 3.29. Khả năng phân biệt của các mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi nang...106
Bảng 3.30. So sánh chênh lệch AUC giữa các cặp mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi nang bằng phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân.....106
Bảng 3.31. Kết quả nội kiểm chuẩn mô hình 4 - Mô hình kết hợp EEVA và hình thái bằng phương pháp Bootstrapping (B = 1000) 109

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Sự phát triển của phôi giai đoạn phân chia không phân mảnh (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh) 5
Hình 1.2. Phôi dâu ngày 4 (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh) 6
Hình 1.3. Phôi nang (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh) 7
Hình 1.4. Sơ lược về khái niệm phân chia phù hợp với giai đoạn phát triển – "stage specific" và không phù hợp với giai đoạn phát triển "non-stage specific" 11
Hình 1.5. Phôi 2 tế bào đa nhân và phân mảnh ≥ 20%, hình ảnh time-lapse [31] 12
Hình 1.6. Các giai đoạn phôi nang (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh) 15
Hình 1.7. Quá trình phát triển phôi đến giai đoạn tiền làm tổ 18
Hình 1.8. Tủ nuôi cấy time-lapse GERI 21
Hình 1.9. Ba chu kỳ phân bào của phôi 26
Hình 1.10. Mô hình lựa chọn phôi của Meseguer [10] 34
Hình 1.11. Mô hình lựa chọn phôi của Petersen [11] 35
Hình 1.12. Mô hình lựa chọn của Carrasco [12] 36
Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt quy trình nghiên cứu 43
Hình 2.2. Kết quả tính cỡ mẫu nghiên cứu bằng phần mềm R 46
Hình 2.3. Giao diện màn hình chấm điểm của hệ thống EEVA phiên bản 3.1 56
Hình 3.1. Phân bố phân độ hình thái phôi nang trong từng điểm EEVA 68
Hình 3.2. Phân bố chất lượng hình thái ICM trong từng điểm EEVA 68
Hình 3.3. Phân bố chất lượng hình thái TE trong từng điểm EEVA 69
Hình 3.4. Phân bố hình thái mức độ giãn nở trong từng điểm EEVA 69
Hình 3.5. Đường cong ROC so sánh hiệu quả các mô hình tiên lượng 108
Hình 3.6. Biểu đồ hiệu chuẩn (calibration plot) 110
Hình 3.7. Nomogram dự đoán xác suất làm tổ sau chuyển một phôi nang đông lạnh - rã đông của mô hình 4. 111

MỞ ĐẦU

Trong điều trị hỗ trợ sinh sản, lựa chọn phôi tối ưu để chuyển hoặc bảo quản lạnh là bước then chốt, ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ thành công của chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm (In Vitro Fertilization - IVF). Việc chọn sai phôi có thể gây thất bại làm tổ, tăng chi phí và kéo dài thời gian điều trị cho các cặp vợ chồng hiếm muộn [1]. Hiện nay, tại phần lớn các trung tâm IVF, chọn phôi vẫn chủ yếu dựa vào các đặc điểm hình thái của phôi tại các mốc thời gian cố định (đánh giá phôi truyền thống). Nhiều hệ thống phân loại hình thái phôi đã được xây dựng và ứng dụng đối với cả phôi giai đoạn phân chia và phôi nang. Tuy nhiên, chưa có một hệ thống nào đạt được sự đồng thuận toàn cầu về tính chính xác và khả năng tiên lượng cao, việc lựa chọn phôi mang tính chủ quan và phụ thuộc vào kinh nghiệm của chuyên viên phôi học [2]. Ngoài ra, trong hệ thống nuôi cấy truyền thống, việc đưa phôi ra khỏi tủ để đánh giá chất lượng làm gián đoạn điều kiện nuôi cấy ổn định. Mặc dù quan sát phôi nhiều lần giúp thu thập thêm dữ liệu về động học phát triển, nhưng đồng thời làm tăng biến động về nhiệt độ, độ ẩm và nồng độ khí CO_2/O_2 - những yếu tố nhạy cảm, ảnh hưởng bất lợi đến sự phát triển của phôi giai đoạn sớm [3].

Hệ thống tủ nuôi cấy time-lapse ra đời nhằm khắc phục các hạn chế của phương pháp đánh giá phôi truyền thống. Với khả năng ghi hình tự động và liên tục, hệ thống này cho phép theo dõi, đánh giá phôi mà không cần đưa phôi ra khỏi tủ, đảm bảo môi trường nuôi cấy ổn định. Đồng thời, nó cung cấp dữ liệu toàn diện về quá trình phát triển của phôi, gồm các thông số động học và những phân chia bất thường mà phương pháp truyền thống có thể bỏ sót [4]. Một số tủ time-lapse tích hợp phần mềm đánh giá phôi tự động như EEVA (Early Embryo Viability Assessment), iDAScore (Intelligent Data Analysis Score), giúp tăng tính khách quan và hiệu quả trong đánh giá phôi.

Trong những năm gần đây, nghiên cứu ứng dụng hệ thống time-lapse tập trung vào việc xác định mối liên quan giữa các chỉ số động học, đặc điểm hình thái và tiềm năng phát triển của phôi, bao gồm khả năng hình thành phôi nang, nguy cơ lệch bội, khả năng làm tổ và phát triển thành trẻ sinh sống [5–7]. Một số nghiên cứu đã ngoại kiểm các phần mềm đánh giá phôi tự động [8,9]. Nhiều mô hình dự đoán đã được xây dựng, từ các thuật toán thủ công đến phần mềm tự động, cũng như các mô hình kết hợp giữa dữ liệu hình thái, động học và phần mềm đánh giá [9–15]. Tuy nhiên, hầu hết các mô hình hiện nay có giá trị tiên lượng còn thấp, chủ yếu do được nội kiểm trên dữ liệu của chính trung tâm phát triển, dẫn đến giảm độ chính xác khi áp dụng ngoại kiểm và hạn chế khả năng ứng dụng rộng rãi [16]. Do đó, mỗi trung tâm nên

có chiến lược tiếp cận, xây dựng, cải tiến các mô hình riêng, dựa trên cơ sở dữ liệu phôi học, công nghệ thiết bị và quy trình thao tác đặc thù của mình. Đây là hướng đi thực tiễn nhằm tối ưu hóa ứng dụng time-lapse trong đánh giá, lựa chọn phôi, và nâng cao hiệu quả điều trị vô sinh bằng IVF một cách bền vững và cá thể hóa [16].

Tại Việt Nam, xu hướng chuyển đơn phôi nang đang dần trở nên phổ biến, giúp giảm tỷ lệ đa thai. Đã có một số nghiên cứu xây dựng mô hình tiên lượng tiềm năng phát triển đến giai đoạn phôi nang, tỷ lệ làm tổ dựa trên đặc điểm động học hình thái, song hiệu quả mô hình còn chưa cao. Các mô hình hiện tại chỉ dựa vào các thông số động học hình thái giai đoạn phôi phân chia để tiên lượng kết quả chuyển phôi ngày 3 [17] và chuyển phôi nang [18].

Vì vậy dựa trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài "**Xây dựng mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi dựa vào EEVA và một số thông số động học hình thái phôi nang**"

1. Mục tiêu nghiên cứu

- ***Mục tiêu 1***: Đánh giá kết quả có thai sau chuyển một phôi nang đông lạnh dựa trên chất lượng phôi theo phần mềm đánh giá phôi EEVA hay có sự kết hợp EEVA và hình thái phôi.
- ***Mục tiêu 2***: Xây dựng mô hình tiên lượng tỷ lệ làm tổ của chuyển một phôi nang đông lạnh dựa vào các phân độ EEVA và một số động học hình thái của phôi nang.

2. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá khả năng tiên lượng của phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA ở giai đoạn ngày 3 về tỷ lệ hình thành phôi và chất lượng hình thái phôi nang.
- Đánh giá mối liên quan giữa một số thông số động học hình thái phôi nang và chất lượng hình thái phôi nang.
- Đánh giá mối liên quan giữa chất lượng hình thái phôi nang và kết quả thai.
- Đánh giá mối liên quan giữa phần mềm đánh giá phôi EEVA và kết quả thai.
- Đánh giá mối liên quan giữa một số thông số động học hình thái phôi nang và kết quả thai.
- Xây dựng và đánh giá mô hình tiên lượng kết quả làm tổ của phôi sau chuyển đơn phôi nang chu kỳ đông lạnh dựa vào phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA, hình thái phôi nang và một số thông số động học hình thái phôi nang.

3. Cơ sở khoa học và ý nghĩa thực tiễn

Cơ sở khoa học:

- Kết quả nghiên cứu cung cấp bằng chứng khoa học xác thực về giá trị tiên lượng sự phát triển phôi của phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA.
- Kết quả nghiên cứu cung cấp thêm bằng chứng khoa học về mối liên quan của một số thông số động học với kết quả có thai, qua đó có thể làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo với các thông số động học mới đối với từng quần thể và nhóm bệnh nhân đặc biệt.
- Xây dựng dữ liệu và minh chứng khoa học cho việc xây dựng mô hình đánh giá chất lượng phôi tối ưu cho mỗi trung tâm.

Ý nghĩa thực tiễn

- Trên cơ sở kết quả nghiên cứu về mô hình đánh giá phôi tại trung tâm, kết quả nghiên cứu được áp dụng tại trung tâm nhằm hỗ trợ cho việc tối ưu lựa chọn phôi chuyển, tư vấn về chất lượng và tiên lượng của phôi chuyển cho bệnh nhân. Giúp bệnh nhân hiếm muộn có thể rút ngắn thời gian điều trị.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam xác thực được giá trị tiên lượng của phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA trong dự đoán khả năng phát triển thành phôi nang, chất lượng hình thái phôi nang và kết quả có thai, đồng thời xây dựng và nội kiểm mô hình tiên lượng lựa chọn phôi chuyển trên dữ liệu bệnh nhân Việt Nam. Nghiên cứu góp phần bổ sung bằng chứng khoa học trong bối cảnh các mô hình tiên lượng trước đây chủ yếu được xây dựng trên các quần thể bệnh nhân nước ngoài với đặc điểm sinh học và quy trình lâm sàng khác biệt.
- Nghiên cứu đã xây dựng mô hình tiên lượng lựa chọn phôi chuyển dựa trên các thông số động học giai đoạn phôi nang (ngày 5,6), kết hợp phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA với hệ thống đánh giá hình thái theo đồng thuận quốc tế hiện hành (Alpha/Istanbul Consensus), thay vì các thông số động học giai đoạn phân cắt (ngày 3) và hệ thống phân loại hình thái ASEBIR như phần lớn các mô hình đã công bố trước đây.
- Nghiên cứu không chỉ xây dựng mô hình tiên lượng mà còn đánh giá toàn diện hiệu năng mô hình thông qua khả năng phân biệt (discrimination), độ phù hợp (calibration) và nội kiểm bằng phương pháp bootstrap 1000 lần, đồng thời xây dựng nomogram hỗ trợ lựa chọn phôi trong thực hành lâm sàng. Mô hình cho khả năng lựa chọn phôi cao hơn so với đánh giá hình thái truyền thống, tạo cơ sở khoa học cho chiến lược chuyển đơn phôi trong chu kỳ chuyển phôi đông lạnh.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Sự phát triển của phôi người tiền làm tổ

1.1.1. Giai đoạn hợp tử

Giai đoạn hợp tử hay tiền nhân là giai đoạn đầu của quá trình phát triển thành phôi được hình thành khi noãn đã thụ tinh. Hợp tử gồm hai tiền nhân. Tiền nhân đực được hình thành gần vị trí tinh trùng thâm nhập. Tiền nhân cái hình thành ở cực bào tương có thoi phân bào. Khoảng 4h sau khi tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI), tiền nhân bắt đầu xuất hiện với kích thước nhỏ và mờ. Khoảng 18h sau tiêm, hai tiền nhân nằm sát nhau, phần tiếp xúc sát nhau tạo thành một mặt phẳng đồng thời các hạt nhân di chuyển và xếp thành hàng cạnh vùng tiếp xúc hai tiền nhân [19].

1.1.2. Giai đoạn phôi phân chia

Sau khi diễn ra sự thụ tinh, hợp tử trải qua một chuỗi các bước phân cắt tế bào - phân chia mà không có sự gia tăng về kích thước, dẫn đến sự giảm đi đáng kể về thể tích tế bào. Quá trình phân chia ban đầu diễn ra với tốc độ khá chậm. Ngày 1, khoảng 24 giờ sau thụ tinh, hợp tử bắt đầu lần phân bào đầu tiên tạo phôi 2 tế bào. Ngày 2, phân bào lần 2 diễn ra khoảng 40 giờ sau thụ tinh. Vào ngày thứ 3, phôi có khoảng 6 - 12 tế bào, và vào ngày thứ 4, phôi có từ 16 - 32 tế bào. Trong những lần phân chia đầu tiên của phôi, các chu kỳ phân bào diễn ra liên tiếp nhau, không có giai đoạn nghỉ của tế bào (G1). Sự tổng hợp DNA ở tế bào con xảy ra tiếp tục ngay sau khi kết thúc chu kỳ phân bào trước đó. Tốc độ phân chia của các phôi bào là khác nhau. Do đó, trong IVF, chúng ta có thể thấy hiện tượng số phôi bào là số lẻ. Sau 3 - 4 lần phân bào, gần như không còn sự đồng bộ trong phân chia của các phôi bào. Tốc độ phân chia của các phôi bào lúc này thường chậm hơn các tế bào bình thường. Trong 3 chu kỳ phân bào đầu tiên, kích thước của phôi thường ít thay đổi. Phôi có 2 đến 16 phôi bào phụ thuộc chủ yếu vào sự dịch mã (translation) từ các chất liệu RNA của mẹ để phân chia [20].

Những bất thường hình thái trong quá trình phát triển phôi:

a. Phân mảnh tế bào

Phân mảnh được tạo ra do các phôi bào luôn thay đổi hình dạng, các phôi bào tiếp xúc hoặc không tiếp xúc với nhau trong quá trình phân chia, vì vậy tạo nên những mảnh vụn tế bào sau phân chia. Phôi có số lượng phân mảnh nhiều thường làm tổ kém hơn có thể là do giảm lượng bào tương sau chu kỳ phân bào bình thường. Nhiều mảnh vụn cũng làm ảnh hưởng tới quá trình phôi kết đặc lại do giảm tiếp xúc giữa các phôi bào với nhau [21].

b. Phôi bào đa nhân

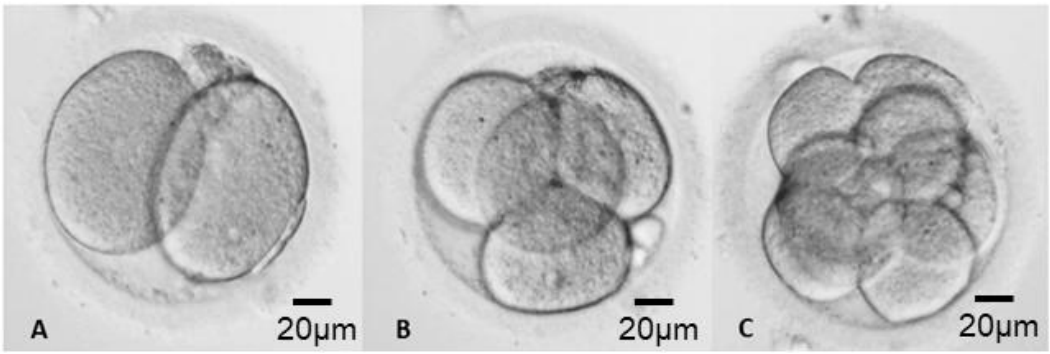
Phôi bào đa nhân có thể xuất hiện ở bất kỳ chu kỳ phân chia nào từ 2 phôi bào đến giai đoạn phôi nang, nhưng quan sát rõ ở giai đoạn phôi phân chia. Ở các giai đoạn sau sẽ khó quan sát hơn do phôi có nhiều phôi bào và mảnh vụn. Phôi bào đa nhân có khả năng làm tổ kém do đó giảm tỷ lệ có thai và tỷ lệ sống sót [22].

c. Kích thước phôi bào không đều

Một trong những nguyên nhân làm kích thước phôi bào không đều là do sự phân chia không đồng bộ và thiếu cân đối hoặc một hay nhiều phôi bào ngừng phân chia. Phôi có kích thước phôi bào to nhỏ không đồng đều cũng có khả năng làm tổ thấp hơn phôi có kích thước phôi bào đồng đều [23].

d. Độ phân chia phôi

Tốc độ phân chia có liên quan đến khả năng sống của phôi. Phôi phân chia chậm thường có khả năng làm tổ kém hơn. Phôi khỏe mạnh có tốc độ phân chia nhanh vào khoảng 18-20 giờ (bình thường 2 phôi bào sau 24 giờ sau ICSI, 4 phôi bào sau khoảng 44 giờ và 8 phôi bào khoảng 68 giờ). Phôi phân chia chậm thường có khả năng làm tổ và sinh sống thấp hơn phôi phát triển bình thường. Vì vậy khi đánh giá lựa chọn phôi, chúng ta thường kết hợp các yếu tố: tốc độ phát triển, hình thái của phôi như số lượng mảnh vụn, kích thước phôi bào, và số lượng nhân tế bào. Trong thực tiễn, phôi có 2 phôi bào thường thấy ở thời điểm 20-26 giờ sau ICSI. Phôi có 4 phôi bào ở thời điểm 36-60 giờ sau ICSI. Phôi có 8 phôi bào ở thời điểm sau 54 giờ và thường trước 72 giờ (Hình **1.1**) [20].



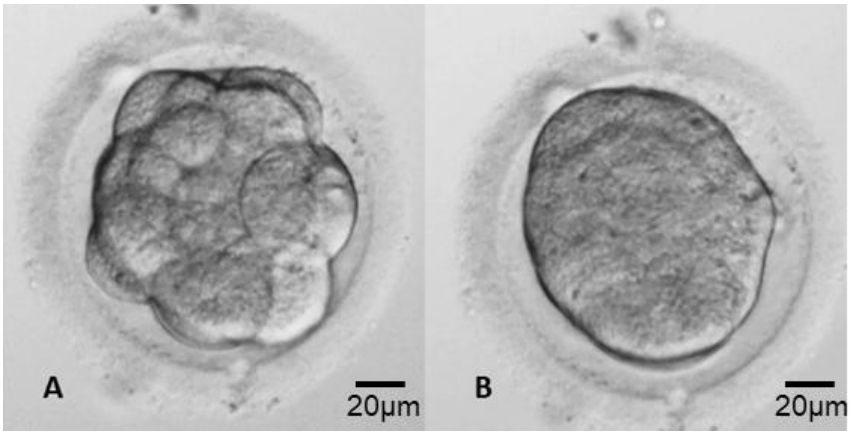
Thanh tỷ lệ: 20µm

Hình 1.1. Sự phát triển của phôi giai đoạn phân chia không phân mảnh (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh)

A: Phôi ngày 1: 2 phôi bào đều nhau, không phân mảnh phôi bào (26 ± 1 giờ sau ICSI). B: Phôi ngày 2: 4 phôi bào đều nhau, không phân mảnh (44 ± 1 giờ sau ICSI). C: Ngày 3: 8 phôi bào đều nhau, không phân mảnh (68 ± 1 giờ sau ICSI) [2]

1.1.3. Giai đoạn phôi dâu

Ở người phôi dâu thường bắt đầu hình thành khi phôi ở giai đoạn 8 phôi bào và bắt đầu quá trình nén. Quá trình phôi nén hình thành các liên kết chặt chẽ giữa các phôi bào, phần phôi bào tiếp xúc với nhau tăng lên và tạo thành một khối. Khi phôi bắt đầu kết đặc lại, các phôi bào tương tác với nhau làm các phôi bào không còn tính toàn năng và đây là sự khởi đầu cho sự sao mã DNA của phôi. Quan sát dưới kính hiển vi, hình thái của phôi dâu được thể hiện bằng sự tăng tiếp xúc giữa các phôi bào, nhưng ranh giới giữa các phôi bào còn nhìn thấy. Khi quá trình nén tăng dần, ranh giới giữa các phôi bào trở nên khó phân biệt do các phôi bào kết liền với nhau (Hình **1.2**). Phôi dâu ở người có thể xuất hiện sớm khoảng 65 giờ sau ICSI, nhưng thường xuất hiện giữa ngày thứ 3 và thứ 4 sau ICSI [24].



Thanh tỷ lệ: 20µm

Hình 1.2. Phôi dâu ngày 4 (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh)

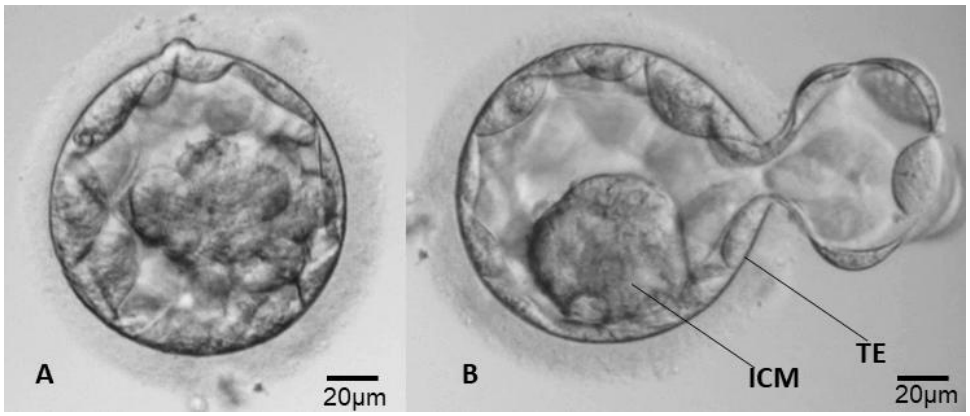
A: phôi đang nén, ranh giới giữa các phôi bào đang mờ dần, B: phôi nén, không còn ranh giới giữa các phôi bào [2]

1.1.4. Giai đoạn phôi nang

Sau giai đoạn nén, phôi bắt đầu nở rộng và tạo khoang chứa dịch bên trong (Hình **1.3**). Các khoang này phát triển nhanh và lớn dần tạo thành một khoang lớn ở giữa phôi tạo điều kiện để phôi bào biệt hóa thành khối tế bào nội phôi ICM (inner cell mass) và lớp tế bào dẹt lớn hay còn gọi là tế bào lá nuôi TE (trophectoderm). Quá trình tạo nang bao gồm sự tích lũy dịch, vận chuyển bởi các tế bào TE.

Khối ICM sau này sẽ phát triển thành cơ thể của thai nhi, và lớp TE sẽ tham gia chính vào quá trình làm tổ, hình thành bánh rau và các phần phụ của thai. Ở người, các khoang dịch bắt đầu hình thành khi phôi ở giai đoạn 20 - 30 tế bào. Cho đến khi phôi chuẩn bị làm tổ, phôi nang có khoảng 100 tế bào. Lớp TE bao gồm những tế bào biệt hóa cao thành dạng dẹt, có kích thước lớn. Các tế bào này hình thành một lớp kín

bao bọc bên ngoài của phôi nang và liên kết với nhau tại các điểm kết nối của các tế bào kế cận. Lớp tế bào dẹt đóng vai trò các "bơm" chủ động để đảm bảo trao đổi chất giữa phôi nang và bên ngoài. Trong giai đoạn làm tổ, các tế bào dẹt phát triển và biệt hóa cao thành các nguyên bào nuôi, tiếp xúc với các tế bào biểu mô của nội mạc tử cung mẹ và sau đó xâm lấn vào các lớp tế bào sâu hơn trong nội mạc tử cung để làm tổ. Lớp tế bào TE này hình thành mô ngoài phôi và không liên quan trực tiếp đến sự phát triển của bản thân phôi thai. Thay vào đó, các tế bào này sẽ hình thành phần phụ của thai gọi là màng rụng, đóng vai trò cung cấp dinh dưỡng và hỗ trợ cho sự phát triển của phôi thai. Ngược lại, ICM bên trong của phôi nang bao gồm những tế bào tròn, nhỏ, phân chia nhanh, các tế bào này ít có sự liên kết, trao đổi, hay biệt hóa cho đến khi phôi làm tổ [24].



Thanh tỷ lệ: 20µm

Hình 1.3. Phôi nang (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh)

A: phôi nang sớm. B: phôi nang đang thoát màng [2]

Sự hình thành và phát triển phôi nang phụ thuộc vào một số yếu tố: chất lượng tinh trùng, noãn, tuổi của mẹ cũng như các yếu tố khác liên quan đến sự phát triển của phôi ở giai đoạn trước đó như: số lượng noãn thu được, số lượng noãn thụ tinh, số lượng hợp tử, và số lượng phôi phát triển đến giai đoạn 8 phôi bào vào ngày 3 cũng ảnh hưởng đến sự hình thành phôi nang. Trong IVF, sự hình thành phôi nang còn phụ thuộc vào chất lượng phòng Lab, hệ thống nuôi cấy, phương pháp nuôi cấy và thành phần của môi trường nuôi cấy. Phôi nang thường hình thành khoảng 100 giờ sau ICSI tương đương 5-6 ngày nuôi cấy [20].

a. Sự biệt hóa tế bào

Ở người, phôi 8 phôi bào vẫn có tính toàn năng, bằng chứng là khi tiến hành chẩn đoán trước làm tổ, nếu sinh thiết một hoặc hai phôi bào thì phôi vẫn có khả năng phát triển tiếp. Tuy nhiên, nếu sinh thiết một phôi bào ở giai đoạn ≤ 4 phôi bào sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi và giảm số lượng nguyên bào phôi (mầm phôi) [25].

Trong quá trình hình thành phôi nang, 2 loại phôi bào được hình thành là tế bào ICM và tế bào TE. Tế bào TE là loại tế bào được biệt hóa đầu tiên trong quá trình hình thành thai. Hai loại tế bào này ngày càng khác nhau khi chúng di chuyển tới các vị trí mới trong quá trình tạo nang. Tế bào TE có hình bầu dục và phân cực trong khi đó tế bào ICM vẫn giữ hình tròn và hình thái không thay đổi. Các tế bào TE nối với nhau qua những phần tiếp xúc bề mặt nhỏ, trong khi đó tế bào ICM tiếp xúc chặt chẽ với nhau tạo thành một khối. Vị trí và sự phát triển của tế bào TE và tế bào ICM phụ thuộc vào sự phân cực và sự hình thành trục phân bào của phôi được hình thành từ khi noãn mới bắt đầu được thụ tinh. Các tế bào ICM di chuyển về phía một cực của phôi gọi là cực phôi, các phôi bào này liên kết chặt với nhau và có đặc tính đa năng. Các tế bào TE tạo thành hàng rào bên ngoài bảo vệ mầm phôi và được biệt hóa để thực hiện chức năng [25].

b. Số lượng phôi bào của phôi nang

Để đảm bảo phôi phát triển và làm tổ, số lượng phôi bào của phôi nang và tỷ lệ giữa số lượng tế bào ICM và số lượng tế bào TE được chi phối và điều hòa bởi hệ thống gen. Ở người, tốc độ phân chia của tế bào TE nhanh hơn so với tốc độ phân chia của tế bào ICM. Tế bào TE nhân đôi khi bắt đầu quá trình tạo nang vào ngày thứ 4 để tạo thành phôi nang vào ngày thứ 5. Trong khi đó, tế bào ICM nhân lên vào ngày thứ 5 và 6. Khi phôi nang lớn dần, tốc độ nhân lên của tế bào TE là 1,5 chu kỳ/ 24 giờ nhanh hơn so với tế bào ICM. Thông thường tổng số phôi bào của phôi nang là trên 60 phôi bào. Ở người, phôi nang ngày 5 có khoảng 60 phôi bào, tăng đến khoảng 160 vào ngày 6 và trên 200 sau khi thoát màng vào ngày 7, 40% số phôi bào tạo mầm phôi [25].

1.2. Đánh giá hình thái phôi

Đánh giá sự phát triển của phôi đóng vai trò quan trọng trong IVF, cung cấp thông tin về quy trình kỹ thuật IVF như kích thích buồng trứng, chọc hút noãn, kết quả thụ tinh, kết quả nuôi cấy phôi, lựa chọn phôi, cũng như tối ưu kết quả điều trị. Trong suốt hơn 40 năm qua, quan sát hình thái vẫn là phương pháp cơ bản của các chuyên viên phôi để lựa chọn và đánh giá chất lượng phôi. Chuyên viên phôi quan sát và ghi nhận các đặc điểm của phôi dưới kính hiển vi, đánh giá mối tương quan giữa các đặc điểm này với tiềm năng làm tổ trong tử cung của từng phôi riêng biệt.

1.2.1. Đánh giá thụ tinh

a. Thụ tinh bình thường (2PN)

Theo cập nhật đồng thuận Istanbul 2025 [2], sự xuất hiện của hình ảnh hai tiền

nhân là dấu hiệu đầu tiên của sự thụ tinh thành công. Kết quả thụ tinh giữa một noãn và một tinh trùng được đánh giá là hoàn tất và bình thường khi quan sát thấy hợp tử có màng bào tương rõ, có hai thể cực và hai tiền nhân. Các tiền nhân nằm sát nhau, có kích thước tương đương nhau và nằm ở trung tâm của bào tương noãn với màng nhân rõ ràng. Số lượng và kích thước của các hạt nhân đều nhau, sắp xếp thẳng hàng và tập trung gần vị trí tiếp xúc của hai tiền nhân là đặc điểm cho thấy tiềm năng phát triển cao của phôi.

Thông thường cả hai tiền nhân xuất hiện cùng thời gian trong khoảng 16 - 20 giờ sau khi cấy noãn với tinh trùng hay thực hiện ICSI. Tiền nhân có thể xuất hiện sớm hơn khoảng 1 giờ ở chu kỳ ICSI so với IVF cổ điển. Theo cập nhật đồng thuận Istanbul 2025 [2], thời điểm kiểm tra thụ tinh nên vào khoảng giờ thứ 16 ± 1 giờ và đánh giá sự hòa nhập hai tiền nhân vào khoảng giờ thứ 23 ± 1 giờ sau ICSI.

b. Thụ tinh 1PN

Noãn thụ tinh 1PN có thể xuất hiện với tỷ lệ khoảng 1% [25]. Nguyên nhân có thể do 2PN không xuất hiện đồng thời, dung hợp màng sớm, hoặc 1PN bị vỡ màng sớm. Ngoài ra có thể hoạt hóa noãn bất thường hoặc không có sự giải nén của nhân tinh trùng, ở những trường hợp này, chỉ có một thể cực được giải phóng. Những phôi có nguồn gốc từ hợp tử 1PN có thể được xem xét để chuyển vào buồng tử cung, khi mà hiện nay nhiều nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng thành công [27,28].

c. Thụ tinh 3PN

Khoảng 1% noãn sau ICSI sẽ biểu hiện ba tiền nhân [20]. Hiện tượng này thể hiện bộ nhiễm sắc thể (NST) tam bội, có thể có nguồn gốc từ hai bộ NST của mẹ hoặc của bố. Bộ NST thêm có nguồn gốc từ mẹ có thể do tinh trùng bình thường thụ tinh với noãn giảm phân bất thường. Ngược lại NST thêm có nguồn gốc từ bố là kết quả của thụ tinh giữa noãn bình thường với tinh trùng lưỡng bội chưa giảm nhiễm hoặc với hai tinh trùng [25]. Tam bội là một trong những bất thường NST ảnh hưởng đến kết quả thai, do đó không nên chuyển phôi từ hợp tử có ba tiền nhân.

1.2.2. Đánh giá phôi phân chia

a. Tốc độ phân chia tế bào

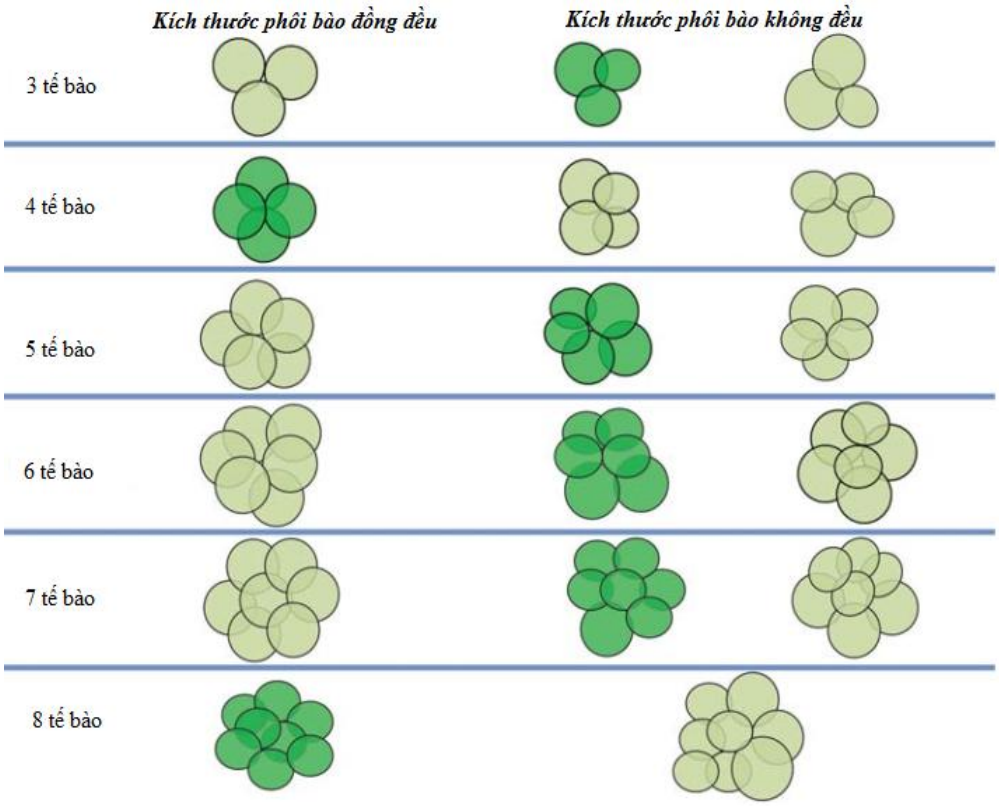
Đánh giá số lượng phôi bào: Số lượng phôi bào có thể coi là tiêu chí đánh giá quan trọng nhất trong việc phân loại phôi giai đoạn phân chia. Người ta nhận thấy rằng những phôi phân chia nhanh có khả năng làm tổ tốt hơn so với các phôi phân chia chậm, ngoại trừ các trường hợp phôi phân chia quá nhanh. Theo cập nhật đồng thuận Istanbul [2], số lượng phôi bào ở ngày 1 (khoảng 26 giờ sau ICSI) nên là 2 phôi

bào, ngày 2 (44 giờ sau ICSI): 4 phôi bào, và ngày 3 (68 giờ sau ICSI): 8 phôi bào. Có nghiên cứu đã chỉ ra rằng phôi ngày 3 có hơn 9 tế bào có tỷ lệ dị bội tăng đáng kể [29]. Một số nghiên cứu nêu lên tỷ lệ phôi làm tổ, tỷ lệ thai sinh sống có mối liên hệ chặt với số lượng phôi bào ngày 3. Chuyển phôi ngày 3 có số lượng phôi bào nhỏ hơn 6 phôi bào có thể là yếu tố tiên lượng cho việc sảy thai sớm [30].

b. Kích thước phôi bào

Bên cạnh số lượng phôi bào, kích thước phôi bào cũng đóng vai trò quan trọng. Theo lý thuyết, quá trình nguyên phân sẽ tạo ra hai phôi bào có kích thước bằng nhau. Các phôi bào không chênh lệch quá 20% về mặt đường kính thì được coi là đồng đều về kích thước [2]. Khi sự phân chia diễn ra không đối xứng, một trong các phôi bào tạo ra sẽ thừa hưởng ít hơn một nửa lượng tế bào chất được nhận từ tế bào mẹ. Sự phân chia không đối xứng, các phôi bào có kích thước không đều, hoặc thay đổi quá 1/3 được cho là yếu tố làm giảm tỷ lệ làm tổ của phôi. Phôi bào này khi tiếp tục phân chia sẽ tạo ra dòng tế bào chứa nhiều khiếm khuyết. Theo nhiều nghiên cứu, phôi 4 và 8 tế bào đều nhau có tỷ lệ làm tổ cao hơn và tỷ lệ đa nhân trong một phôi bào, tỷ lệ lệch bội thấp hơn so với các loại phôi khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy những phôi có sự đồng đều phôi bào cao ở giai đoạn ngày 2 có tiềm năng thành công cao hơn. Sự phân chia không đều có thể dẫn đến sự phân phối không đều các phân tử trong tế bào chất như protein và mRNA, và đã được ghi nhận là có tương quan đến sự gia tăng tỷ lệ lệch bội.

Đặc biệt trong động học phát triển của phôi, phân chia phù hợp với giai đoạn phát triển (stage-specific) là quá trình phân chia tế bào xảy ra đúng theo trật tự và thời điểm sinh lý bình thường của sự phát triển phôi người. Các sự kiện phân chia diễn ra tuần tự, theo trình tự bình thường: 1 tế bào thành 2 tế bào, 2 tế bào thành 4 tế bào, 4 thành 8 tế bào, không xuất hiện phân chia "bất thường" như tách không đồng bộ hay phân chia trực tiếp (direct cleavage) từ 1 thành 3 tế bào. Phân chia "stage-specific" là dấu hiệu của sự điều hòa phân bào bình thường, thể hiện hoạt động chính xác của trục thoi phân bào, bộ máy phân chia, và chu kỳ tế bào. Phân chia không phù hợp với giai đoạn phát triển "non-stage-specific" là sự phân chia xảy ra không tuân theo trình tự sinh lý bình thường, hoặc có bất thường về số lượng tế bào sinh ra từ một lần phân chia, phân chia trực tiếp. Phôi có phân chia "non-stage-specific" thường giảm khả năng phát triển thành phôi nang và tỷ lệ làm tổ thấp. Đây là dấu hiệu gián tiếp của bất thường di truyền hoặc cơ học phân chia, ví dụ sai sót trong phân ly nhiễm sắc thể hoặc bất đối xứng phân bào (Hình **1.4**) [20]. Do đó, tính "stage-specific" được xem là một tiêu chí hình thái quan trọng trong đánh giá phôi. Tiêu chí này gián tiếp phản ánh tiềm năng phát triển bình thường của phôi trong IVF.



Hình 1.4. Sơ lược về khái niệm phân chia phù hợp với giai đoạn phát triển – "stage-specific" và không phù hợp với giai đoạn phát triển "non-stage-specific"

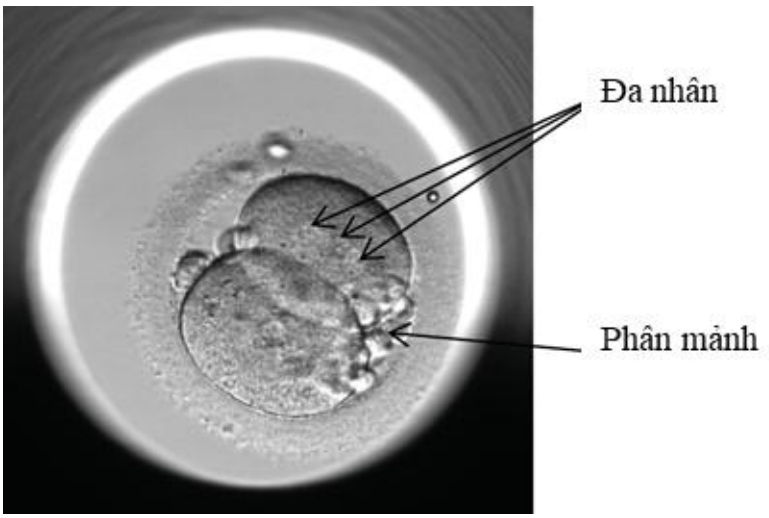
Màu xanh đậm thể hiện sự phân chia phù hợp với giai đoạn phát triển (stage-specific), màu nhạt thể hiện sự phân chia không phù hợp với giai đoạn phát triển (non-stage-specific) [20]

c. Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương (hay tỷ lệ phân mảnh bào tương)

Mảnh vỡ là những phần bào tương, mảnh vụn có màng tế bào bao quanh (Hình **1.5**), không có nhân, có nguồn gốc từ sự phân chia của các phôi bào. Phôi không có hay có ít mảnh vỡ được coi là phôi có khả năng làm tổ cao hơn các phôi khác. Độ phân mảnh được tính trên tổng thể tích của bào tương. Đối với những phôi có nhiều mảnh vỡ, việc đánh giá phôi cần thận trọng vì có những mảnh vỡ to có kích thước gần bằng phôi bào nhưng không có nhân so với phôi bào. Mảnh vỡ bào tương có kích thước <45 µm (ngày 2), < 40 µm (ngày 3) hoặc chênh lệch quá 50% so với các phôi bào bình thường. Một phôi có hơn 25% thể tích là mảnh vỡ có thể tương đương với 1 phôi ngày 2 có 4 tế bào sau rã đông bị mất 1 phôi bào. Tỷ lệ mảnh vỡ cao làm giảm tỷ lệ hình thành phôi nang, tỷ lệ làm tổ và có thai [2,20].

Ngoài ra, mảnh vỡ bào tương được cho là liên quan đến các rối loạn trong quá trình phân bào và chết tế bào theo chương trình (apoptosis) của phôi. Sự hiện diện nhiều mảnh vỡ có thể phản ánh tình trạng căng thẳng (stress) tế bào hoặc điều kiện

nuôi cấy chưa tối ưu. Vì vậy, mức độ phân mảnh là một tiêu chí quan trọng trong đánh giá chất lượng phôi và lựa chọn phôi trong IVF [2].



Đường kính giếng time-lapse: 250µm

Hình 1.5. Phôi 2 tế bào đa nhân và phân mảnh ≥ 20%, hình ảnh time-lapse [31]

d. Đa nhân

Đa nhân là hiện tượng xuất hiện nhiều hơn 1 nhân ở ít nhất 1 phôi bào của phôi giai đoạn phân cắt. Hiện tượng này có thể được xác định tại thời điểm lần đầu phân cắt của phôi vào phôi ngày 2, ngày 3 (Hình **1.5**). Hiện tượng đa nhân có thể tiên lượng được tiềm năng làm tổ của phôi. Phôi có nhiều phôi bào đa nhân sẽ có tỷ lệ có thai, làm tổ, và sinh sống kém. Ngoài ra, hiện tượng đa nhân được cho là có liên quan tới phôi bất thường nhiễm sắc thể. Đa nhân khiến cho phôi có nhiều mảnh vỡ, giảm số lượng phôi bào vào ngày 2, ngày 3, giảm tỷ lệ tạo thành phôi nang [32].

e. Các chỉ tiêu phụ

Bào tương rỗ, có không bào: Bất thường bào tương như bào tương hạt, bào tương rỗ và sự xuất hiện của không bào cũng được coi là một tiêu chí để đánh giá phôi ngày 2, 3. Tuy nhiên khả năng tiên lượng của những tiêu chí này đối với chất lượng phôi và khả năng làm tổ vẫn chưa rõ ràng. Đối với không bào, nếu xuất hiện với số lượng ít và không bào nhỏ, thì có thể bỏ qua, nhưng nếu trong trường hợp quá nhiều không bào, hoặc không bào lớn, việc đánh giá phôi cần phải thận trọng vì nhiều không bào, không bào to có thể gây ảnh hưởng tới sự phát triển trong không gian của phôi. Không bào to hơn 14µm làm giảm khả năng thụ tinh và chất lượng phôi [2].

1.2.3. Đánh giá phôi dâu

Giai đoạn phôi dâu là giai đoạn chuyển tiếp, rất khó để đánh giá số lượng phôi bào khi các tế bào nén lại. Thường phôi dâu tốt sẽ thấy qua được vẻ ngoài, khi phôi

bắt đầu có khoang hoặc đang nén lại. Giai đoạn phôi ngày 4 có giá trị chọn lọc phôi tốt hơn so với giai đoạn phân cắt trước đó, không chỉ bởi đã được hoạt hóa bộ gen của phôi mà còn bởi phôi đã phát triển đến giai đoạn nén. Vào ngày thứ 4, phôi được chia thành hai loại: nén và không nén. Phôi nén bao gồm phôi đang nén, phôi nén hoàn toàn và phôi nang sớm. Giai đoạn phôi đang nén được xác định khi các phôi bào bắt đầu hòa nhập, các tế bào khó phân biệt rõ ràng. Ở giai đoạn phôi nén hoàn toàn, các tế bào nén chặt, ranh giới các tế bào có thể không nhìn thấy nhưng xác định được nhân. Đánh giá phôi ngày 4 thường vào khoảng 92-96 giờ ICSI [2].

Về tỷ lệ phôi bào tham gia vào quá trình nén, một số trường hợp không phải tất cả phôi bào đều tham gia nén. Các tế bào bị loại trừ thường là tế bào xấu và bị loại trừ bởi chọn lọc tự nhiên. Cũng có những tế bào phát triển chậm hơn và tham gia nén sau sẽ gây khó khăn cho việc đánh giá. Tỷ lệ phôi bào tham gia nén liên quan trực tiếp đến kích thước phôi nén. Hình thái của phôi nén là yếu tố quan trọng nhất trong đánh giá chất lượng phôi ở giai đoạn phôi ngày 4. Phôi được xác định là nén tốt khi là một khối đa bào hình cầu hoặc gần hình cầu. Bề mặt khối tế bào mịn và không có các vết lõm sâu (nhỏ hơn một nửa đường kính phôi bào). Ở một số phôi, ngay cả khi phần lớn phôi bào trải qua quá trình nén, hình thái phôi vẫn có bất thường nghiêm trọng. Đôi khi, phôi nén có thể chia thùy như hai hoặc ba khối tế bào nhỏ. Sự phân mảnh cũng là một yếu tố quyết định điểm phôi nén. Phôi < 25% mảnh vỡ vẫn có thể được xếp loại là tốt nếu khối đa bào hình thành đã nén chặt. Khi độ phân mảnh > 25%, phôi sẽ bị xếp loại kém hơn vì thường chỉ có một khối đa bào nhỏ được hình thành, mặc dù tất cả các phôi bào đều đã tham gia vào quá trình nén. Phôi không có hiện tượng nén vào ngày 4 được coi là phôi phát triển chậm. Theo Fabozzi và cộng sự năm 2015, phôi dâu được xác định là phôi nén, có ≥14 phôi bào [33].

1.2.4. Đánh giá phôi nang

Hệ thống đánh giá hình thái phôi giai đoạn phôi nang được 2 tác giả là Gardner D. K. và Schoolcraft W. B. đề cập lần đầu tiên vào năm 1999 đã nhanh chóng được áp dụng tại hầu hết các trung tâm IVF trên thế giới [34].

Hình thái phôi nang được đánh giá dựa trên 3 tiêu chuẩn là độ nở rộng của khoang phôi (blastocoel expansion) và mức độ thoát màng (hatching status), đặc điểm của tế bào ICM và TE.

a. Đánh giá bước 1

Ở giai đoạn phôi dâu, bắt đầu có sự tích lũy dịch giữa các tế bào, khi thể tích dịch tăng lên, hình thành lỗ hổng và dần tạo nên khoang phôi nang. Hiện tượng này xảy ra vào giai đoạn ngày 4 và ngày 5 của quá trình nuôi cấy phôi. Sự tăng lên của

dịch trong khoang phôi nang và số lượng tế bào làm tăng kích thước của phôi, dẫn đến màng trong suốt (zona pellucida-ZP) mỏng đi. Cuối cùng, màng ZP vỡ giải phóng khối tế bào gọi là hiện tượng thoát màng (hatching). Quá trình phát triển của phôi từ giai đoạn nén chặt của các tế bào đến giai đoạn có cấu trúc là phôi nang vẫn chưa được hiểu rõ hoàn toàn. Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu nhận thấy, các tế bào nằm ở phần rìa ngoài phôi nang trở nên dẹt ra và liên kết chặt chẽ với các tế bào lân cận, tạo ra một rào chắn giữa bên ngoài và bên trong của phôi, một điều kiện tiên quyết để hình thành phôi nang. Quá trình hình thành khoang phôi nang là nhờ sự hoạt động của kênh xuyên màng Na/K-ATPase của các tế bào ở giai đoạn phôi dâu. Các kênh này bơm Na+ và K+ vào khoang phôi nang làm tăng áp suất thẩm thấu, kết quả là nước thẩm thấu vào khoang phôi nang, từ đó làm gia tăng áp lực nước và làm tăng dần kích thước của khoang phôi nang. Phôi nang được chấm điểm từ 1 đến 6 dựa vào độ nở của khoang phôi nang và mức độ thoát màng [34] (Hình **1.6**):

- Giai đoạn 1: phôi nang sớm (early blastocyst: BL1) khi khoang dịch chiếm dưới 50% tổng thể tích của phôi.
- Giai đoạn 2: phôi nang (blastocyst: BL2) khi khoang dịch chiếm từ trên 50% tổng thể tích của phôi.
- Giai đoạn 3: phôi nang đầy (full blastocyst: BL3) khi khoang chiếm hết thể tích của phôi.
- Giai đoạn 4: phôi nang nở rộng (expanded blastocyst: BL4) khi khoang dịch phát triển rộng làm cho màng trong suốt bắt đầu mỏng dần.
- Giai đoạn 5: phôi nang đang thoát màng (hatching blastocyst: BL5) khi tế bào TE bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt.
- Giai đoạn 6: phôi nang đã thoát màng (hatched blastocyst: BL6) khi phôi nang đã hoàn toàn thoát ra khỏi màng trong suốt.

b. Đánh giá bước 2

Khi phôi nang đạt được độ nở rộng ≥ BL3 thì có thể dễ dàng quan sát 2 phần tế bào mới hình thành. Phần tế bào TE ở bên ngoài phôi giúp định hình cấu trúc phôi nang, phần tế bào ICM ở một cực của phôi nang sẽ phát triển thành phôi thai. Do đó đánh giá phôi nang từ BL3 trở lên cần đánh giá thêm chất lượng tế bào ICM và TE.

Hình thái ICM có sự dao động rất lớn phụ thuộc vào số lượng và độ nén chặt của các tế bào. Theo đó, hình thái ICM được phân thành 3 loại [34]:

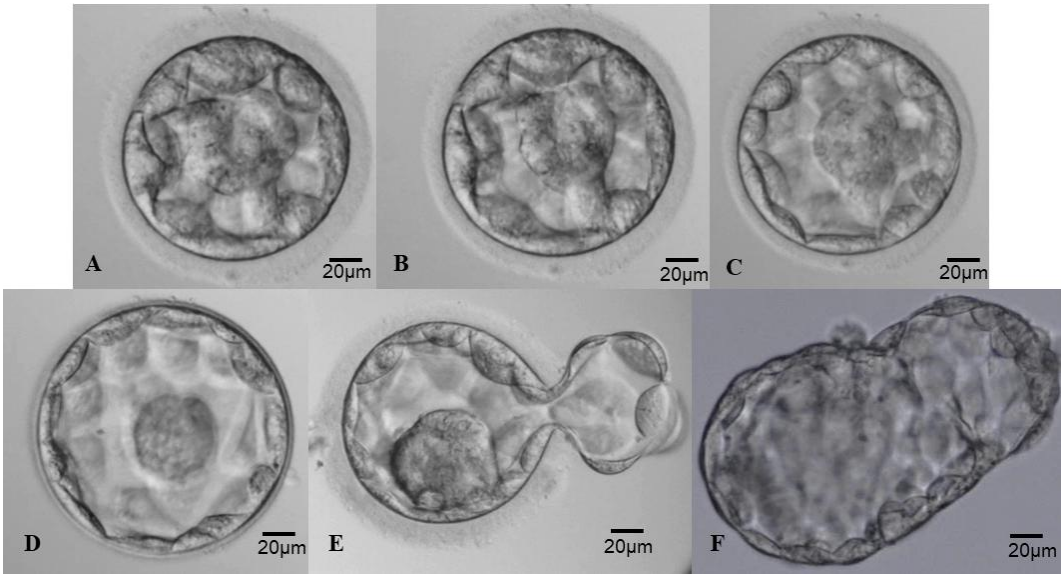
- Loại A: khi có rất nhiều tế bào liên kết chặt chẽ với nhau
- Loại B: khi vài tế bào liên kết lỏng lẻo.
- Loại C: khi có rất ít tế bào liên kết lỏng lẻo

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng giữa hình thái khối tế bào nội phôi ICM và kết quả lâm sàng có mối tương quan tỷ lệ thuận với nhau, giả thuyết đưa ra rằng khối tế bào nội phôi ICM càng lớn và nén chặt cho khả năng làm tổ càng cao [35].

Tương tự như ICM, lớp tế bào lá nuôi TE có thể được phân biệt rõ ràng khi phôi có độ nở ≥ BL3, TE đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn hình thành khoang phôi nang để tạo ra chất lỏng chứa đầy khoang phôi nang [36]. Hơn nữa, TE cũng đóng vai trò quan trọng ở giai đoạn làm tổ của phôi giúp phôi bám dính và ăn sâu vào lớp niêm mạc tử cung. Các tế bào TE cũng sản xuất ra một số phân tử hỗ trợ quá trình làm tổ. Nếu không nhờ vào chức năng phá vỡ màng ZP của lớp tế bào TE thì quá trình thoát màng của phôi không diễn ra [20]. Ở giai đoạn sau của phôi thai, các tế bào TE phát triển thành màng ối và nhau thai. Tế bào TE được phân thành 3 loại [34]:

- Loại A: chứa nhiều tế bào gắn kết với nhau hình thành biểu mô liên tục
- Loại B: chứa số lượng tế bào ít hơn tạo lớp biểu mô mỏng, liên kết lỏng lẻo
- Loại C: số lượng các tế bào rất ít, tế bào có kích thước lớn, liên kết lỏng lẻo.

Mặc dù cách đánh giá hình thái của Gardner D. K. chưa bao hàm trọn vẹn các đặc điểm về hình thái của phôi nang, đặc biệt là những trường hợp có các yếu tố không theo quy luật, nhưng ưu điểm của cách phân loại này là rất dễ áp dụng và đã phân loại được phôi nang dựa trên 3 tiêu chí quan trọng. Đây cũng là 3 thành phần cấu tạo chính của phôi nang, đó là: sự phát triển độ nở của khoang phôi nang, đặc điểm của lớp tế bào lá nuôi TE, và đặc điểm của khối tế bào nội phôi ICM.



Thanh tỷ lệ: 20µm

Hình 1.6. Các giai đoạn phôi nang (hình ảnh time-lapse tại IVF Tâm Anh)

***A**. Phôi nang sớm; **B**. Phôi nang; **C**. Phôi nang đầy; **D**. Phôi nang nở rộng; **E**. Phôi nang đang thoát màng; **F**. Phôi nang đã thoát màng* [2]

1.3. Các phương pháp đánh giá lựa chọn phôi khác

Các hệ thống phân loại hình thái phôi hiện nay yêu cầu đánh giá phôi liên tục trong suốt quá trình phát triển, từ giai đoạn phân cắt đến phôi nang, dựa trên quan sát hình ảnh tĩnh dưới kính hiển vi quang học. Mặc dù đây là phương pháp không xâm lấn, nhưng nó vẫn tồn tại nhiều hạn chế đáng kể. Việc phải thường xuyên đưa phôi ra khỏi tủ ấm để quan sát làm phôi tiếp xúc với các điều kiện nuôi cấy không tối ưu, bao gồm biến động về ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm và pH môi trường. Những thay đổi này khó có thể kiểm soát hoàn toàn, trong khi sự phát triển của phôi có thể biến đổi nhanh chóng chỉ trong vài giờ, dẫn đến sự không nhất quán trong kết quả đánh giá [3].

Ngoài ra, các phôi được nuôi cấy kéo dài đến ngày thứ 5 sẽ phải trải qua nhiều lần thao tác hơn, không chỉ để quan sát đánh giá chất lượng phôi mà còn để thay môi trường nuôi cấy, từ đó làm tăng nguy cơ ảnh hưởng bất lợi đến sự phát triển. Mặc dù việc nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang giúp loại bỏ các phôi ngừng phát triển sớm, hình thái phôi nang vẫn có sự biến thiên đáng kể. Đáng chú ý, những phôi có hình thái bình thường vẫn có thể tồn tại bất thường như lệch bội nhiễm sắc thể. Do đó, đánh giá hình thái đơn thuần không phản ánh đầy đủ yếu tố di truyền ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi trước và sau khi làm tổ [2,34].

Nhằm cải thiện khả năng lựa chọn phôi có tiềm năng làm tổ cao, nhiều phương pháp thay thế đã được phát triển, bao gồm cả kỹ thuật xâm lấn như xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (Preimplantation Genetic Testing – PGT), các phương pháp không xâm lấn như phân tích dấu ấn sinh học của phôi (embryo biomarker) và công nghệ theo dõi phôi time-lapse. Trong luận án này, chúng tôi tập trung trình bày công nghệ theo dõi phôi time-lapse, một phương pháp đánh giá phôi không xâm lấn.

1.3.1. Đánh giá phôi bằng xét nghiệm di truyền tiền làm tổ (PGT)

Xét nghiệm di truyền tiền làm tổ PGT là phương pháp đánh giá chất lượng phôi ở cấp độ di truyền, cho phép phát hiện sớm các bất thường nhiễm sắc thể (NST) hoặc đơn gen trước khi phôi được chuyển vào buồng tử cung. Mục tiêu chính của PGT là lựa chọn phôi có bộ NST bình thường, nhằm tăng khả năng làm tổ, giảm nguy cơ sảy thai tự nhiên và hạn chế chuyển phôi mang bệnh di truyền, đặc biệt trong các trường hợp bệnh nhân có nguy cơ cao [37].

Trong thực hành lâm sàng, PGT được chia thành ba nhóm chính: PGT-A (Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy) dùng để phát hiện lệch bội nhiễm sắc thể; PGT-M (Monogenic Disorders) nhằm sàng lọc bệnh gen đơn; và PGT-SR (Structural Rearrangements) để phát hiện các bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể [38]. Hiện nay, PGT-A là kỹ thuật phổ biến nhất trong các trung tâm IVF, đặc biệt ở nhóm

bệnh nhân có tiên lượng kém như phụ nữ lớn tuổi, thất bại làm tổ tái phát hoặc sảy thai nhiều lần [39], giúp cải thiện tỷ lệ làm tổ và kết cục thai kỳ.

Phôi thường được sinh thiết ở giai đoạn phôi nang ngày 5 hoặc ngày 6, lấy một số tế bào TE để hạn chế tác động đến khối tế bào ICM. Mẫu tế bào được khuếch đại toàn bộ hệ gen (Whole Genome Amplification - WGA) và phân tích bằng các kỹ thuật tiên tiến như array - CGH, SNP microarray, hoặc giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS). Trong đó, NGS hiện được xem là tiêu chuẩn vàng nhờ độ phân giải cao và khả năng phát hiện bất thường lệch bội nhỏ cũng như tình trạng thể khảm mosaicism - sự tồn tại đồng thời của tế bào bình thường và bất thường trong cùng một phôi ở các mức độ khác nhau [39].

Kết quả PGT cho phép phân loại phôi thành phôi chuẩn bội (euploid), lệch bội (aneuploid) hoặc khảm (mosaic), hỗ trợ quá trình ra quyết định lựa chọn phôi chuyển tối ưu. Mặc dù PGT-A cho thấy hiệu quả trong việc tăng tỷ lệ có thai và giảm sảy thai ở nhóm bệnh nhân nguy cơ cao, kỹ thuật này vẫn còn một số hạn chế như chi phí cao, yêu cầu nhân sự tay nghề cao và khả năng sai lệch kết quả do tính không đồng nhất của phôi [39]. Gần đây, hướng nghiên cứu PGT không xâm lấn (non-invasive PGT - niPGT) thông qua việc phân tích DNA tự do trong dịch nuôi cấy phôi được xem là một bước tiến tiềm năng, giúp giảm thiểu tổn thương phôi và tăng tính ứng dụng lâm sàng trong các trung tâm hỗ trợ sinh sản hiện đại [39].

1.3.2. Đánh giá phôi sử dụng dấu hiệu sinh học của phôi (Embryo biomarkers)

Nhằm khắc phục những hạn chế của phương pháp đánh giá hình thái, việc nghiên cứu các embryo biomarkers đã được đề xuất như một hướng tiếp cận không xâm lấn để dự đoán tiềm năng làm tổ. Các biomarker này có thể liên quan tích cực hoặc tiêu cực đến kết quả mang thai và được thu thập từ môi trường nuôi cấy phôi sau sử dụng [40]. Dựa trên bản chất sinh học, embryo biomarkers được chia thành ba nhóm chính: (1) proteomics - phân tích toàn bộ protein phản ánh chức năng tế bào, (2) metabolomics - đánh giá hoạt động chuyển hóa thông qua sự tiêu thụ và sản sinh các chất nền, và (3) microRNA (miRNA) - các phân tử RNA nhỏ không mã hóa có vai trò điều hòa biểu hiện gen [41,40].

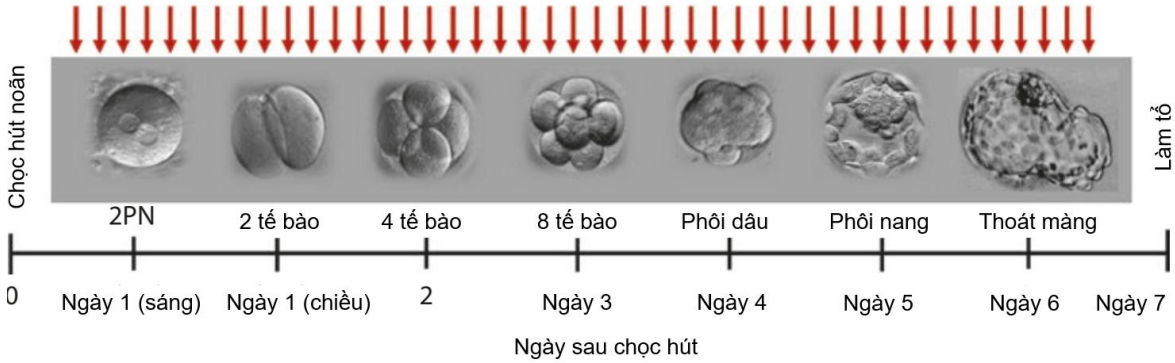
Nhiều nghiên cứu cho thấy các phôi có cùng mức phân loại hình thái vẫn có thể khác biệt đáng kể về các dấu hiệu sinh học (biomarker) trong môi trường nuôi cấy, cho thấy đánh giá hình thái đơn thuần không phản ánh đầy đủ trạng thái sinh lý của phôi. Tuy nhiên, dù các kỹ thuật này mang lại tiềm năng cung cấp thông tin sâu hơn về sự phát triển, nhưng việc ứng dụng trong thực hành lâm sàng vẫn còn hạn chế, bằng chứng chưa đủ mạnh để thay thế các phương pháp đánh giá truyền thống [41].

Một trong những rào cản chính là chi phí thiết bị, vật tư môi trường cao, trong khi nồng độ các phân tử này trong môi trường nuôi cấy rất thấp, đòi hỏi các phương pháp phân tích có độ nhạy và độ tin cậy cao, cùng với quy trình chuẩn hóa trong thu thập và bảo quản mẫu. Hơn nữa, các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên hiện chưa chứng minh được giá trị dự đoán vượt trội so với phương pháp đánh giá hình thái truyền thống [40,41]. Do đó, cần có thêm nghiên cứu để xác định và xác nhận các biomarker có ý nghĩa đối với khả năng làm tổ và kết cục lâm sàng.

1.4. Hệ thống nuôi cấy phôi sử dụng công nghệ theo dõi phôi time-lapse

1.4.1. Giới thiệu chung

Hệ thống tủ nuôi cấy time-lapse là một nền tảng tích hợp giữa buồng nuôi cấy ổn định môi trường và hệ thống chụp ảnh tự động liên tục theo thời gian thực, những hình ảnh này sau đó có thể được ghép lại và phát dưới dạng chuỗi thời gian để quan sát hình thái cũng như thời gian diễn ra các sự kiện khác nhau trong suốt quá trình phát triển của phôi, cho phép đánh giá phôi mà không cần phải đưa phôi ra khỏi tủ ấm (Hình **1.7**). Công nghệ này giúp duy trì điều kiện nuôi cấy tối ưu, đồng thời cung cấp thông tin động học hình thái chi tiết về các mốc phân chia tế bào và các sự kiện hình thái vi mô mà các phương pháp đánh giá truyền thống khó quan sát được.



Hình 1.7. Quá trình phát triển phôi đến giai đoạn tiền làm tổ

Đánh giá phôi truyền thống. Mũi tên là thời điểm bằng hệ thống time-lapse [4]

Trước đây, việc đánh giá phôi chủ yếu sử dụng phương pháp đánh giá phôi truyền thống dựa trên quan sát hình thái học tại các thời điểm cố định, buộc phải đưa phôi ra khỏi tủ nuôi cấy để soi dưới kính hiển vi. Quá trình này tiềm ẩn nguy cơ làm gián đoạn điều kiện nuôi dưỡng tối ưu, như thay đổi nhiệt độ, độ pH hoặc nồng độ khí, đồng thời hạn chế khả năng ghi nhận những biến đổi động học quan trọng xảy ra giữa các thời điểm quan sát [3]. Trên thực tế, chất lượng phôi có thể thay đổi đáng kể chỉ trong vòng vài giờ đồng hồ. Những hạn chế này có thể dẫn đến đánh giá thiếu chính xác về tiềm năng phát triển của phôi [4].

Hệ thống time-lapse được phát triển nhằm giải quyết cho vấn đề này. Có hai lợi ích chính, đó là (1) cải thiện khả năng bảo toàn tính toàn vẹn sinh lý của phôi, do phôi được duy trì trong điều kiện ổn định về nhiệt độ, độ ẩm và thành phần khí suốt quá trình nuôi cấy và (2) cung cấp toàn bộ thông tin về quá trình phát triển của phôi, xác định được các mốc thời gian về các sự kiện, qua đó cung cấp thêm thông tin phục vụ việc đánh giá phôi, giúp quá trình đánh giá phôi được linh hoạt, chính xác và hiệu quả hơn. Đồng thời, dữ liệu hình ảnh phong phú từ time-lapse còn cung cấp nền tảng để phát triển các thuật toán đánh giá động học và mô hình dự đoán khả năng làm tổ của phôi dựa trên phần mềm đánh giá phôi, trí tuệ nhân tạo, hướng tới tự động hóa và cá nhân hóa trong lựa chọn phôi chuyển [42]. Ưu thế chính của hệ thống time-lapse là cho thấy một bức tranh toàn diện hơn về sự phát triển của phôi so với đánh giá hình thái thông thường dựa trên quan sát tĩnh truyền thống.

Nhiều hệ thống time-lapse thương mại đã được xây dựng và phát triển như tủ nuôi cấy EmbryoScope, hệ thống Primo Vision (Vitrolife), Early Embryo Viability Assessment (Eeva, Auxogyn, Inc.), tủ nuôi cấy GERI (Genea Biomeds), và tủ nuôi cấy MIRI (ESCO). Trong khi tủ nuôi cấy EmbryoScope, GERI và MIRI là những hệ thống tủ nuôi cấy độc lập, trong tủ có gắn camera chụp ảnh của phôi trong quá trình nuôi cấy, hệ thống Primo Vision và EEVA là những máy nhỏ gọn có thể chứa đĩa nuôi cấy, có gắn camera nhưng để được trong tủ nuôi cấy thông thường. Các hệ thống này sử dụng hai kỹ thuật ánh sáng khác nhau để chụp hình ảnh phôi: trường sáng và trường tối. Công nghệ trường tối tạo ra sự tương phản bằng cách tận dụng sự tán xạ ánh sáng để phát hiện ra sự phân chia tế bào. Ngược lại, công nghệ trường sáng tận dụng sự hấp thụ ánh sáng của phôi để tạo ra độ tương phản nên có thể phát hiện cả sự phân chia tế bào lẫn sự xuất hiện của nhân và các chi tiết khác của tế bào. Ưu thế lớn của nó là cho phép phân biệt những phần mảnh vỡ lớn và phôi bào trong quá trình phát triển của phôi, cũng như xác định rõ các bất thường như sự đa nhân của phôi bào. Đáng chú ý là với cả hai công nghệ, sự tiếp xúc của phôi với ánh sáng đều ít hơn so với kỹ thuật thông thường và hầu hết đều loại bỏ ánh sáng ngắn dưới 550 nm, vốn được biết là có thể gây hại cho sự phát triển của phôi [43]. Ví dụ hệ thống EEVA sử dụng kính hiển vi trường tối với diode phát quang (LED) 625 nm. Hệ thống này sẽ chụp ảnh ở từng mặt phẳng tiêu cự mỗi 5 phút, phơi sáng 0,032 giây/ảnh, như vậy tổng các ảnh chụp trong vòng 3 ngày chỉ tương đương với 15 - 48 giây soi trên kính hiển vi thông thường [44]. Hệ thống EmbryoScope sử dụng công nghệ trường sáng với đèn LED 635 nm. Hệ thống này cũng cho phép tùy chỉnh nhiều hơn, có thể chụp từ 1 - 9 mặt phẳng tiêu cự sau mỗi 10 phút. Tổng lượng phơi sáng với mỗi phôi trong 5 ngày chỉ ở mức 53 - 99 J/m^2 so với 394 - 776 J/m^2 khi quan sát với kính hiển vi

thông thường. Các hệ thống có thể dùng những loại đĩa nuôi cấy, cách điều chỉnh nhiệt độ, loại khí, hệ thống lọc khác nhau, cũng như những phần mềm độc quyền để phân tích hình ảnh và chú thích các mốc động học riêng, được tóm tắt trong Bảng **1.1**.

Bảng 1.1. Đặc điểm các hệ thống nuôi cấy time-lapse thương mại hiện nay

Tên	Tủ	Trường sáng (mm)	Số mặt phẳng tiêu cự	Tần suất (Phút)	Số phôi/ đĩa	Số bệnh nhân	Phần mềm
Embryo Scope	Độc lập	Sáng 635	1 - 9	2 - 10	12	6	KIDScore
Embryo Scope+	Độc lập	Sáng 635	11	10	16	15	KIDScore iDAScore
EEVA	Tích hợp	Tối 625	1	5	12	1	EEVA Test
GERI	Độc lập	Sáng λ dài	1 - 11	5	16	6	EEVA test
Miri TL	Độc lập	Sáng 635	3 - 7	5	14	6	Miri TL
Primo Vision +	Tích hợp	Sáng 590 nm	3 - 11	10 - 60	9 - 16	1	Primo Vision

1.4.2. Hệ thống nuôi cấy phôi time-lapse GERI

Time-lapse GERI là hệ thống tủ nuôi cấy quan sát phôi liên tục, dạng nhỏ gọn kết hợp hình time-lapse để ghi lại các giai đoạn phát triển quan trọng của quá trình phát triển phôi. Hệ thống kỹ thuật này cho phép lưu lại toàn bộ dữ liệu, thông tin về quá trình phát triển của phôi trong suốt thời gian nuôi cấy bên ngoài cơ thể. Tủ được thiết kế để cung cấp nuôi riêng cho từng bệnh nhân mà không bị xáo trộn và cung cấp các điều kiện nuôi cấy ổn định trong một môi trường tối ưu.

Một tủ nuôi cấy time-lapse GERI có sáu buồng nuôi cấy riêng lẻ, mỗi buồng được sử dụng nuôi cấy phôi của một bệnh nhân duy nhất, nhằm duy trì điều kiện nuôi cấy ổn định và bảo quản phôi ở nhiệt độ gần với nhiệt độ cơ thể. Mỗi buồng nuôi cấy sử dụng một đĩa nuôi cấy time-lapse GERI có 16 giếng nhỏ để nuôi tối đa 16 phôi. Mỗi buồng nuôi cấy đều có máy ảnh chuyên dụng riêng, chụp tối đa mười một mặt

phẳng tiêu cự, hình ảnh mặt cắt của phôi được chụp mỗi 5 phút một lần ở độ phân giải 2560 x 1928 pixel. Điều này giúp cung cấp được hình ảnh về quá trình phát triển của phôi, giúp cho các chuyên viên phôi đánh giá chất lượng hình thái của phôi mà không phải lấy phôi ra ngoài tủ nuôi cấy để quan sát dưới kính hiển vi. Tủ nuôi cấy cung cấp nhanh thông tin các buồng chứa phôi bằng cách nhìn vào màn hình LCD riêng cho từng buồng hoặc màn hình chính của GERI hiển thị tổng quan về tất cả các buồng nuôi cấy (Hình **1.8**), thuận tiện cho việc theo dõi đồng thời nhiều bệnh nhân.



Hình 1.8. Tủ nuôi cấy time-lapse GERI

1.5. Đánh giá chất lượng phôi bằng hệ thống time-lapse

1.5.1. Đặc điểm hình thái phôi quan sát qua hệ thống time-lapse

Quan sát hình thái tại các mốc thời gian cố định vẫn đang là tiêu chuẩn để đánh giá tiềm năng phát triển của phôi. Phương pháp này cho phép xác định tốc độ phát triển và đặc điểm hình thái tại các thời điểm cụ thể sau thụ tinh. Một số hệ thống phân loại khác nhau đã được đề xuất để đánh giá hợp tử ở giai đoạn tiền nhân, giai đoạn phôi phân cắt và phôi nang [2]. Các nghiên cứu hiện tại cho thấy một vài thông số hình thái có thể dự báo độc lập tiềm năng của phôi. Tuy nhiên tỷ lệ làm tổ của phôi ngày 3 lựa chọn bằng hình thái cổ điển vẫn chỉ dừng lại ở khoảng 40% [45]. Như vậy hình thái phôi quan sát tại một hoặc một vài thời điểm không phải luôn luôn phản ánh chính xác tiềm năng phôi. Bên cạnh việc quan sát giống với đánh giá cổ điển, hệ thống time-lapse còn cho phép phát hiện những dấu mốc phát triển của phôi có thể bị bỏ qua, đồng thời vẫn đảm bảo sự ổn định của hệ thống nuôi cấy. Tuy vậy, hệ thống này vẫn còn một số giới hạn như không cho phép xoay các góc độ của phôi, nên chưa thể quan sát chi tiết hơn trong trường hợp các phôi bào chồng lên nhau trên mặt phẳng quan sát hoặc xuất hiện nhiều mảnh vỡ tế bào gây khó đánh giá chính xác.

a. Giai đoạn hợp tử

Sự xuất hiện của hai tiền nhân (PN) xảy ra khoảng 16 - 18 giờ sau khi tiến hành thụ tinh. Đánh giá thụ tinh tại một thời điểm cố định có thể bỏ qua sự hình thành và mất đi của một hoặc cả hai PN. Hệ thống time-lapse giúp khắc phục được hạn chế

này, các hình ảnh dễ dàng được tua lại để quan sát, tránh việc loại bỏ các hợp tử lưỡng bội đã trải qua quá trình biến mất hoặc hợp nhất hai tiền nhân ở thời điểm sớm. Hệ thống này cũng cho phép theo dõi vị trí của PN trong tế bào chất. Đối với sự phát triển bình thường của phôi, các PN sẽ di chuyển vào vị trí trung tâm, những phôi không có hiện tượng này thường có tiềm năng tạo phôi nang thấp hơn [46].

b. Giai đoạn phân cắt

Thông thường lần phân chia đầu tiên diễn ra vào cuối ngày 1 và đạt tới giai đoạn 4 hoặc 8 tế bào vào ngày 2 và ngày 3. Đánh giá hình thái phôi truyền thống bao gồm tiêu chuẩn số lượng tế bào, tỷ lệ phân mảnh, độ đồng đều tế bào, đa nhân, và hiện tượng nén của phôi bào. Tuy nhiên, những yếu tố này có thể thay đổi nhanh trong quá trình phát triển của phôi, nghĩa là sự xuất hiện hay vắng mặt của một vài đặc điểm có thể phụ thuộc vào thời điểm đánh giá. Hệ thống time-lapse có thể khắc phục hạn chế này khi cho phép theo dõi quá trình xuất hiện, biến mất của những mảnh vỡ hay hiện tượng đa nhân theo thời gian thực liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy.

(1). Hiện tượng đa nhân

Đặc điểm phôi bào đa nhân xuất hiện trong thời gian ngắn, do đó hệ thống time-lapse sẽ giúp xác định chính xác. Nghiên cứu cho thấy trong những phôi xuất hiện đa nhân khi quan sát bằng time-lapse, chỉ có 27,6% số phôi được phát hiện trong những mốc thời gian đánh giá theo đồng thuận Istanbul [2]. Có tới hơn 50% số phôi đa nhân giai đoạn 2 tế bào phát triển thành phôi hoàn toàn đơn nhân ở giai đoạn 4 tế bào [47], song cũng không phải tất cả các phôi đa nhân ở 4 tế bào cũng xuất hiện đặc điểm này ở giai đoạn trước đó. Hiện tượng đa nhân có thể phản ánh thông số động học của quá trình phát triển phôi. Những phôi đa nhân ở giai đoạn 2 tế bào có thời gian phân chia tới giai đoạn 2 và 5 tế bào dài hơn các phôi khác ($p < 0,001$) [48,47]. Bên cạnh đó, mối tương quan giữa hiện tượng đa nhân với lệch bội ở phôi hiện nay vẫn chưa rõ ràng. Nghiên cứu của Balakier chỉ ra không thấy có sự khác biệt về tỷ lệ đa nhân giữa phôi chuẩn bội và lệch bội, và hiện tượng tự chỉnh sửa (đa nhân ở giai đoạn 2 tế bào nhưng đơn nhân ở giai đoạn sau) xuất hiện ở cả những phôi chuẩn bội (78%) và lệch bội (57%) [47]. Kết quả mối tương quan giữa đa nhân và tỷ lệ làm tổ vẫn còn chưa được khẳng định rõ. Đặc điểm đa nhân trong một số nghiên cứu cho thấy có thể làm giảm tỷ lệ làm tổ (23,3% so với 43,4%, $p < 0,001$) [48], tuy nhiên lại cho thấy không có sự tương quan rõ trong một số nghiên cứu khác [49].

(2). Sự phân mảnh

Một số nguyên nhân gây ra hiện tượng phân mảnh đã được biết tới bao gồm pH, nhiệt độ và nồng độ oxy của môi trường nuôi cấy không ổn định. Hiện tượng

phân mảnh tăng lên sẽ làm giảm tỷ lệ hình thành phôi nang, do mất đi một phần bào tương và các ti thể, protein liên quan [50]. Mảnh vỡ lớn được phân biệt với phôi bào bằng sự vắng mặt của hạt nhân. Tuy nhiên đánh giá phôi truyền thống có thể bỏ sót sự hiện diện của hạt nhân, ảnh hưởng đến tính chính xác khi phân loại phôi. Hiện tượng phân mảnh được xem là dấu hiệu làm giảm tiềm năng phát triển của phôi, nhưng nghiên cứu time-lapse của Mizobe (2016) chứng minh không có sự khác biệt về tỷ lệ tạo phôi nang hoặc phôi nang chất lượng tốt giữa nhóm phân mảnh < 10% và 10 - 50% ở giai đoạn 2 hoặc 4 tế bào [50]. Ngược lại, nghiên cứu của Azzarello (2016) đánh giá về sự hiện diện của những mảnh vỡ lớn (> 45µm không có nhân) và sự phân chia bất thường có ảnh hưởng đến kết quả tạo phôi. Với đánh giá phôi truyền thống, phôi 4 tế bào vào ngày 2 có tỷ lệ sinh sống cao hơn so với phôi có ít hoặc nhiều hơn 4 tế bào. Song khi đánh giá lại qua hình ảnh time-lapse, có tới 18,3% số phôi 4 tế bào trải qua hiện tượng phân chia bất thường và/hoặc có tỷ lệ phân mảnh > 25%, những phôi này đều không có thai sau chuyển. Sau khi phân tích hiệu chỉnh, tác giả nhận thấy số phôi bào vào ngày 2 không còn ảnh hưởng tới tỷ lệ trẻ sinh sống [51]. Như vậy có thể thấy đặc điểm phân mảnh và phân chia bất thường đóng vai trò quan trọng đối với tiềm năng phát triển của phôi trong bối cảnh đánh giá động học hiện tại.

(3). Phân chia bất thường

Một số hiện tượng phân chia bất thường đã được mô tả trong y văn bao gồm: (1) Phân chia trực tiếp (phân chia từ 1 thành 3 tế bào, song thuật ngữ này lần đầu tiên được sử dụng năm 2012 lại mô tả hiện tượng phân chia nhanh từ 2 thành 3 tế bào trong vòng dưới 5 giờ); (2) Phân chia hỗn loạn (rối loạn phân chia tới giai đoạn 4 tế bào); (3) Phân chia ngược (hòa nhập hai tế bào chị em sau khi hoàn thành phân chia của tế bào trước đó hoặc thất bại phân chia tế bào sau khi đã phân chia nhân); (4) Rối loạn phân chia (phân chia của một tế bào bị muộn hơn khi tế bào khác đã qua lần phân chia tiếp theo) và (5) Không đạt được 6 điểm liên kết ở giai đoạn 8 tế bào [52].

Phân chia trực tiếp từ 1 thành 3 tế bào dễ nhìn thấy nhất trong chu kỳ phân bào thứ nhất và thứ hai (từ hợp tử thành 3 tế bào hoặc từ 2 thành 5 hoặc 6 tế bào), có thể có hoặc không kèm theo hiện tượng đa nhân. Sự phân chia này có thể liên quan đến lỗi thoi vô sắc, ví dụ như có 3 cực phân bào. Theo báo cáo của Zaninovic, hiện tượng phân chia trực tiếp xảy ra ở 12% số phôi: 58% ở lần phân chia đầu tiên, 25% ở lần phân chia thứ hai, và 6,7% ở lần phân chia thứ 3. Tác giả cũng nhận xét tỷ lệ phát triển phôi giảm mạnh ở nhóm này khi chỉ có 9% số phôi phân chia trực tiếp phát triển đến giai đoạn phôi nang và có thể đông lạnh lại. Phân chia trực tiếp ngay trong lần phân bào đầu tiên cho tỷ lệ phát triển phôi kém hơn so với ở những lần phân chia tiếp theo [53]. Phân chia nhanh (phân chia từ 2 thành 3 tế bào trong vòng dưới 5 giờ) được

cho là một trong những thông số có tính chọn lọc về chất lượng phôi, xảy ra ở trung bình khoảng 14% số phôi trong nhiều nghiên cứu [54]. Một số báo cáo cho thấy những phôi này có tiềm năng làm tổ thấp, tránh lựa chọn trong chuyển phôi [20].

Nghiên cứu của Liu và cộng sự (2015) quan sát hiện tượng phân chia ngược ở 6,8% số phôi, trong khoảng từ 24 đến 136 giờ sau ICSI. Trong số những phôi lên đến giai đoạn phôi nang, hiện tượng này xảy ra khoảng từ 24 đến 89 giờ sau ICSI. Nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ phân chia ngược xảy ra nhiều hơn ở phôi có hiện tượng đa nhân so với đơn nhân ($p < 0,01$). Tác giả giải thích cơ chế điều hòa sự phân chia ngược có thể là do ảnh hưởng từ môi trường xung quanh noãn trong suốt quá trình sinh noãn. Phân chia ngược ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ phôi nang, sự phát triển của phôi, dẫn đến khả năng làm tổ kém. Đối với mỗi phôi, tình trạng này có thể xảy ra nhiều lần ở bất kỳ giai đoạn nào trong 3 ngày đầu nuôi cấy. Nó liên quan đến các yếu tố ảnh hưởng đến cả trứng và tinh trùng. Phân chia ngược thường đi kèm với những bất thường về động học, tăng nguy cơ khảm và lệch bội [55]. Nghiên cứu khác của Balakier đánh giá hiện tượng phân chia ngược ở phôi sau rã đông. Tác giả báo cáo rằng tùy thuộc vào giai đoạn xảy ra hiện tượng hòa nhập phôi bào, phôi có thể trở thành đa bội hoàn toàn (giai đoạn 2 - 3 tế bào) hoặc thành phôi khảm. Tần suất xuất hiện hiện tượng phân chia ngược trong giai đoạn ngày 2 là 4,6% và ngày 3 là 1,5% đối với phôi sau rã đông. Nguyên nhân có thể do khiếm khuyết trên màng tế bào, gây ra bởi nhiều tác nhân gây ảnh hưởng đến màng như virus hoặc đông - rã phôi [56].

Nghiên cứu của Almagor thống kê 15,6% những hiện tượng phân chia bất thường xảy ra ở lần phân chia đầu tiên và/hoặc thứ hai [57]. Ở những trường hợp noãn non nuôi trưởng thành biểu hiện phân chia bất thường rất cao. Kết quả một nghiên cứu cho thấy 337 trên 345 phôi (97,7%) có hiện tượng bất thường bao gồm các dạng: phân chia trực tiếp (từ 1 tế bào phân chia ra hơn 2 tế bào), phôi bào không đều nhau, nhiều mảnh vỡ, mảnh vỡ tế bào kích thước lớn, ngừng phân chia. Tỷ lệ phôi nang tốt thấp hơn ở nhóm phôi có phân chia bất thường, bao gồm mảnh vỡ kích thước lớn, ngừng phân chia, phân chia trực tiếp, phân chia không đều, phân chia ngược, và dạng kết hợp của những đặc điểm trên [58]. Theo nghiên cứu của Yang và cộng sự (2015), những phôi có bất thường phân chia nặng bao gồm: ngừng phân chia, phân chia trực tiếp và hỗn loạn có tỷ lệ tạo phôi nang rất thấp. Những phôi bất thường nhẹ hơn như chuyển động tế bào chất, phân chia 2 tế bào con không đồng đều, phôi phân mảnh nhiều cũng giảm tỷ lệ phôi nang ở mức độ trung bình. Tác giả xây dựng một mô hình phân cấp từ A đến F dựa trên thời điểm phân chia bất thường, cho kết quả dự báo tỷ lệ tạo phôi nang và phôi nang tốt ở mức độ tin cậy ($p < 0,001$), tỷ lệ làm tổ cũng giảm theo phân loại từ A đến D (67,0% đến 0%, $p < 0,001$) [58].

1.5.2. Động học hình thái phôi

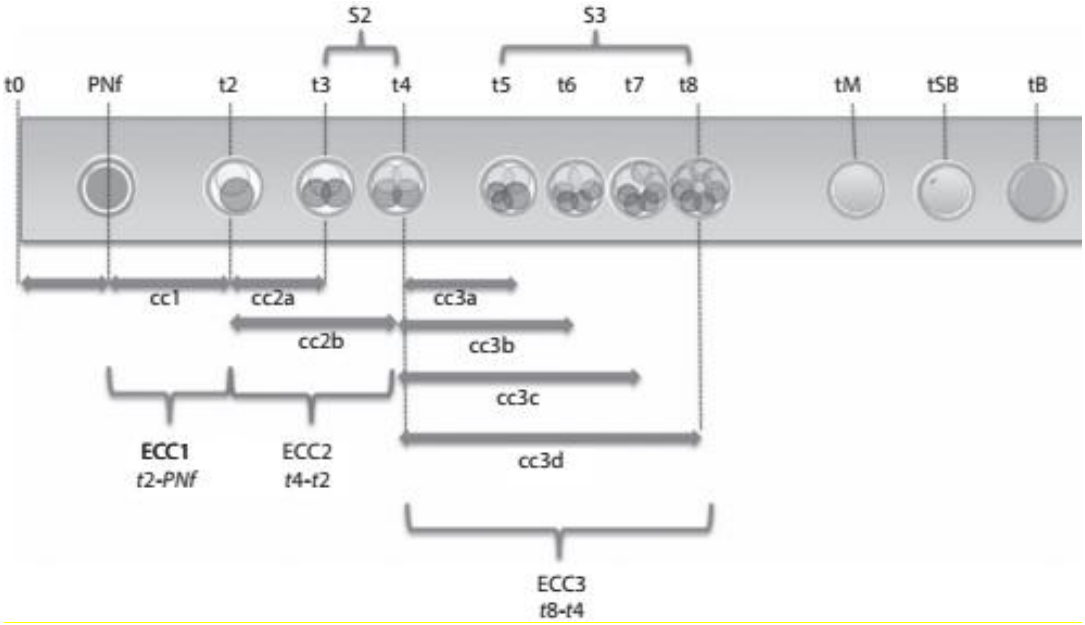
Một chu kỳ tế bào là một chuỗi các sự kiện phức tạp bao gồm các quá trình của nhân và tế bào nhất qua các giai đoạn nhất định, đảm bảo từ một tế bào phân chia thành hai tế bào chị em (Hình **1.9**). Các chu kỳ tế bào ở phôi tiền làm tổ có liên quan đến tiềm năng sống của phôi. Chu kỳ tế bào diễn ra quá nhanh hoặc quá chậm đều có thể do lỗi DNA, tái cấu trúc tế bào hoặc lỗi sai khi phôi trải qua các giai đoạn của chu kỳ tế bào, tất cả đều có thể làm giảm sự phát triển của phôi [4].

Cho đến nay, đánh giá hình thái truyền thống vẫn là tiêu chuẩn để lựa chọn phôi ở nhiều phòng Lab IVF. Nhiều hệ thống phân loại phôi đã ra đời từ giai đoạn hợp tử, phân cắt đến giai đoạn phôi nang [2]. Với cách tiếp cận này, việc đánh giá có thể diễn ra tại một hoặc nhiều giai đoạn trong toàn bộ quá trình phát triển của phôi. Trong khi nhiều nghiên cứu đã chỉ ra một hoặc nhiều chỉ số hình thái có thể giúp tiên lượng và lựa chọn phôi, tỷ lệ làm tổ của phôi vẫn chỉ thành công ở mức độ giới hạn, như với phôi giai đoạn ngày 3 là khoảng 40% [45]. Điều này cho thấy việc đánh giá hình thái phôi ở một hoặc một vài thời điểm chưa phản ánh chính xác tiềm năng phát triển của phôi. Do đó, cần có các phương pháp đánh giá bổ sung nhằm cải thiện khả năng tiên lượng và lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển tối ưu.

Động học hình thái được định nghĩa là sự kết hợp của hai yếu tố: Hình thái bên ngoài của phôi và thời gian các sự kiện diễn ra ở cấp độ tế bào. Đây là một khái niệm mới được đưa ra nhằm nâng cao hiệu quả lựa chọn phôi [4]. Chiến lược này giúp cho việc chuyển đơn phôi trở nên đáng tin cậy hơn mà không làm giảm tỷ lệ thành công chung của IVF. Nhiều nghiên cứu về mốc thời gian của các sự kiện và khoảng thời gian giữa các mốc sự kiện này đã được thực hiện. Kết quả cho thấy có mối liên quan đến khả năng phát triển của phôi thai [4]. Các thông số động học hình thái có mức độ liên quan và khả năng tiên lượng sự phát triển của phôi khác nhau. Sự kết hợp nhiều thông số thường mang lại giá trị tiên lượng cao hơn, trong khi giá trị tiên lượng của từng thông số riêng lẻ chưa nhất quán giữa các nghiên cứu và các trung tâm khác nhau. Do đó, xu hướng hiện nay là kết hợp nhiều thông số động học nhằm cải thiện khả năng dự báo kết cục của phôi. Và đây là tiền đề cho các nghiên cứu về các thông số động học và sự kết hợp của các thông số động học liên quan tới sự phát triển của phôi thai [4]. Điều này đặt ra nhu cầu xây dựng các mô hình tiên lượng, nhằm tối ưu hóa giá trị của các thông số động học trong lựa chọn phôi.

Hệ thống time-lapse theo dõi phôi liên tục cung cấp cho chúng ta video về quá trình phát triển của phôi, qua đó cho phép phát hiện những mốc về thời gian trong sự phát triển đó của phôi. Một phần quan trọng trong việc ứng dụng time-lapse là việc

quyết định sử dụng chỉ số động học hình thái nào để chú thích và đánh giá. Cho đến hiện tại, các phần mềm chú thích tự động vẫn chưa thể đảm bảo hoàn toàn tính chính xác. Hơn nữa, phần mềm có thể gây sai lệch lặp lại, ảnh hưởng tới hiệu suất của các mô hình dự báo, do vậy vẫn cần có chuyên viên phôi giám sát, sửa chữa và thực hiện các chương trình kiểm soát chất lượng phù hợp. Điều này cho thấy việc kết hợp giữa công nghệ tự động và đánh giá của chuyên viên phôi vẫn đóng vai trò then chốt trong ứng dụng time-lapse. Để tối ưu hiệu quả, mỗi trung tâm nên đánh giá dữ liệu của mình để phát triển những thuật toán nội bộ hoặc chiến lược lựa chọn phôi phù hợp với đặc điểm quần thể bệnh nhân và điều kiện nuôi cấy [16]. Ngoài ra, việc chuẩn hóa cách định nghĩa và ghi nhận các mốc thời gian cũng là yếu tố quan trọng nhằm đảm bảo tính tái lập và so sánh giữa các nghiên cứu. Một số mốc thời gian, khoảng thời gian giữa các sự kiện được đưa vào trong nhiều nghiên cứu được tổng hợp trong Bảng **1.2**, Bảng **1.3** theo khuyến cáo của Hiệp hội Sinh sản và Phôi học châu Âu (ESHRE) 2020 [4], được áp dụng rộng rãi trong thực hành lâm sàng.



Hình 1.9. Ba chu kỳ phân bào của phôi

Lược đồ về chu kỳ tế bào của phôi bào (blastomere cell cycle - cc) và chu kỳ tế bào của phôi (embryo cell cycle - ECCs). Chu kỳ tế bào của phôi bào a được tính bằng t3 - t2 và ký hiệu dưới dạng cc2a, với phôi bào b là cc2b = t4 - t2. Chu kỳ tế bào của phôi khi đạt từ 2 tế bào thành 4 tế bào cũng được tính bằng t4 - t2. Tương tự áp dụng với chu kỳ tế bào thứ 3 của phôi và phôi bào, tn: được định nghĩa là thời gian phôi đạt n tế bào. PNf: thời gian tiền nhân của hợp tử vừa biến mất. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén, tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tB: thời gian phôi nang đầy khoang [20] *(Bảng **1.2**, Bảng **1.3**)*

Bảng 1.2. Các mốc thời gian sự kiện động học hình thái và định nghĩa [4]

Ký hiệu	Định nghĩa
t0	Thời điểm tiến hành thụ tinh bằng IVF hoặc ICSI
tPB2	Thời điểm thể cực thứ hai tách ra hoàn toàn từ màng bào tương
tPNa	Thời điểm xuất hiện tiền nhân (tPN1a, tPN2a, tPN3a…)
tPNf	Thời điểm tiền nhân biến mất (tPN1f; tPN2f…)
tn	Thời điểm phôi xuất hiện dấu hiệu đạt đến số lượng n phôi bào (ví dụ: t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9)
tSC	Thời điểm bắt đầu hiện tượng nén các phôi bào
tM	Thời điểm quá trình nén kết thúc (hình ảnh cuối cùng trước khi xuất hiện hiện tượng tạo khoang).
tSB	Thời điểm phôi nang bắt đầu tạo khoang
tB	Thời điểm khoang chiếm toàn bộ thể tích phôi (hình ảnh phôi trước khi màng ZP bắt đầu mỏng đi)
tEB	Thời điểm phôi nang bắt đầu nở rộng, màng ZP bắt đầu mỏng đi.
tHN	Thời điểm phôi nang bắt đầu thoát màng.
tHD	Thời điểm phôi nang thoát màng toàn bộ

Bảng 1.3. Khoảng thời gian giữa các sự kiện động học và định nghĩa [4]

Ký hiệu	Công thức	Định nghĩa
VP	tPNf - tPNa	Khoảng thời gian xuất hiện tiền nhân
ECC1	t2 - tPB2	Khoảng thời gian chu kỳ phân bào thứ nhất
ECC2	t4 - t2	Khoảng thời gian chu kỳ phân bào thứ hai
ECC3	t8 - t4	Khoảng thời gian chu kỳ phân bào thứ ba
cc2	cc2a = t3 - t2 cc2b = t4 - t2	Khoảng thời gian phân chia của từng tế bào trong chu kỳ phân bào
cc3	cc3a = t5 - t4 cc3b = t6 - t4 cc3c = t7 - t4 cc3d = t8 - t4	Khoảng thời gian phân chia của từng tế bào trong chu kỳ phân bào
s2	t4 - t3	Sự đồng bộ của lần phân chia tế bào thứ 2
s3	t8 - t5	Sự đồng bộ của lần phân chia tế bào thứ 3
dCom	tM-tSC	Khoảng thời gian phôi nén
dB	tB-tSB	Khoảng thời gian tạo khoang phôi nang
dExp	tHN-tEB	Khoảng thời gian phôi nang nở rộng
dHN	tHD-tHN	Khoảng thời gian phôi thoát màng

1.6. Hệ thống phần mềm đánh giá phôi tích hợp trong hệ thống time-lapse

1.6.1. Ứng dụng các mô hình phần mềm đánh giá phôi

Các mô hình phân tích động học hình thái phôi tạo điều kiện cho quy trình làm việc linh hoạt, cải thiện tính nhất quán và giảm sự khác biệt giữa các chuyên viên phôi học. Tuy nhiên, chúng cũng gây khó khăn trong việc theo dõi, quản lý các dữ liệu được thu nhận từ time-lapse, đồng thời tăng khối lượng công việc trong phòng Lab IVF. Điều này đã thúc đẩy sự phát triển của công nghệ đánh giá phôi tự động. Ban đầu, các phần mềm này dựa trên thị giác máy tính truyền thống (traditional computer vision), sử dụng thuật toán để phân tích hình ảnh phôi dựa trên các đặc trưng lập trình sẵn. Trong những năm gần đây, học sâu (deep learning) đã được áp dụng - vẫn dựa trên thị giác máy tính (computer vision) nhưng tiên tiến hơn, cho phép tự động học các đặc trưng từ dữ liệu hình ảnh và video time-lapse, mà không cần giả định hay lập trình trước. Nhờ đó, học sâu giúp dự báo kết quả làm tổ một cách khách quan và đồng nhất hơn so với đánh giá thủ công. Trí tuệ nhân tạo cũng đã bước đầu đưa vào áp dụng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, đặc biệt là với nguồn dữ liệu khổng lồ từ hình ảnh time-lapse, với hy vọng đem lại kết quả khả quan trong tương lai.

Trí tuệ nhân tạo (AI) là một khái niệm chung bao gồm nhiều phương pháp tiếp cận toán học khác nhau có khả năng đưa ra dự đoán dựa trên nhận dạng mẫu phức tạp bằng cách kết hợp sức mạnh xử lý của máy tính. Một mô hình AI được xác định bằng thuật toán và trọng số của từng tham số tham gia, nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả, phân loại hoặc tiên lượng trong nhiều lĩnh vực ứng dụng khác nhau [59].

Việc lựa chọn mô hình học máy (machine learning) được xác định bởi nhiệm vụ dự định (ví dụ: phân loại so với hồi quy so với xếp hạng), các đặc điểm của tập dữ liệu (ví dụ: kích thước, dữ liệu có nhãn/không có nhãn, dữ liệu có cấu trúc so với dữ liệu không có cấu trúc) và phương pháp học đã lập kế hoạch (ví dụ: có giám sát, không giám sát). Dựa trên các biến này, các nhà khoa học có thể lựa chọn trong số một số phương pháp tiếp cận khác nhau để xây dựng các thuật toán với các khả năng học khác nhau (tức là học nông - shallow hoặc học sâu - deep learning, học máy có giám sát - supervised learning). Một số ví dụ về các thuật toán học bao gồm mạng lưới thần kinh nhân tạo (Artificial neural networks - ANN), máy vectơ hỗ trợ (support vector machines - SVM), mạng lưới nơ - ron sâu (Deep neural network - DNN) và cây quyết định (Decision tree - DT), rừng ngẫu nhiên (Random forest - RF)… [60]. Việc lựa chọn các mô hình học máy rất khó khăn, điều này giải thích tại sao đôi khi có thể thử nghiệm nhiều mô hình cùng một lúc. Chavez-Badiola và cộng sự (2020) đã phát triển thuật toán dựa trên thị giác nhân tạo và học máy để dự đoán kết quả thai

sau chuyển phôi từ hình thái phôi và tuổi mẹ. Tác giả sử dụng dữ liệu từ 221 chu kỳ chuyển phôi đã biết kết quả làm tổ và tạo ra một hệ thống đánh giá bao gồm các bước phân loại khác nhau dựa trên đặc điểm hình thái phôi trích xuất từ vi ảnh kỹ thuật số cùng các dữ liệu phi hình thái khác để dự báo. Các tác giả đã trình bày một ví dụ như vậy như một bằng chứng về khái niệm khi năm thuật toán khác nhau được đào tạo và thử nghiệm trên hai tập dữ liệu để đánh giá khả năng khái quát hóa của chúng nhằm dự đoán tỷ lệ làm tổ. Phân tích sử dụng 5 mô hình phân loại khác nhau, bao gồm hồi quy Bayesian tính xác suất trung bình, SVM, DNN, DT và RF có kiểm chứng chéo để đánh giá khả năng khái quát. Nghiên cứu chia làm hai bộ dữ liệu: bộ A với phân tích SVM được F1-score (hệ số dung hòa giữa độ chính xác và độ nhạy) là 0,74 với AUC đạt 0,77, trong khi bộ B với phân tích RF cho F1 - score đạt 0,71 và AUC là 0,75. Như vậy kết quả trên cho thấy hệ thống phân loại này có thể dự đoán kết quả thai dựa trên hình ảnh kỹ thuật số duy nhất của phôi khi chuyển, từ đó đưa ra một cách tiếp cận mới với lợi thế là sử dụng cơ sở dữ liệu nhỏ, khả thi với các môi trường phòng Lab IVF khác nhau và dễ dàng tích hợp vào thực hành lâm sàng. Nghiên cứu này trình bày một ví dụ về cách tiếp cận này có thể hướng dẫn các nhà khoa học trong quá trình lựa chọn mô hình hướng tới triển khai lâm sàng. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, quy mô hạn chế của các tập dữ liệu có thể giải thích hiệu suất kém của ANN, khiến việc so sánh thực tế với ANN có khả năng không đầy đủ [61].

Một số nghiên cứu khác đã thử nghiệm nhiều mô hình [62], bao gồm mô tả của VerMilyea và cộng sự (2020) về cách các kiến trúc mô hình và siêu tham số khác nhau (tức là hàm mất mát và phương pháp tối ưu hóa) được xem xét trước khi xây dựng kiến trúc cuối cùng của chúng [63]. Nhìn chung, các kết quả này cho thấy ngay cả khi được huấn luyện trên cùng một tập dữ liệu, các thuật toán khác nhau vẫn có thể cho hiệu suất khác nhau, qua đó nhấn mạnh tầm quan trọng của việc thiết kế phương pháp tính toán và mô hình toán học một cách hợp lý.

1.6.2. Hệ thống phần mềm đánh giá khả năng sống của phôi ở giai đoạn sớm (Early Embryo Viability Assessment system - EEVA)

Hệ thống phần mềm đánh giá phôi EEVA là phần mềm độc quyền đánh giá phôi tự động ở giai đoạn phát triển sớm của phôi (giai đoạn phôi phân chia) mà không xâm lấn đến phôi. Phần mềm được tích hợp riêng trong tủ nuôi cấy time-lapse GERI. Đây là phần mềm đầu tiên được cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận, và kiểm chứng về độ an toàn. EEVA có khả năng tiên lượng phôi ở giai đoạn phân chia sớm (phôi ngày 3) có thể phát triển đến giai đoạn phôi nang [64].

Hệ thống EEVA hoạt động dựa trên nền tảng của thị giác máy tính (Computer

Vision) kết hợp với các thuật toán phân tích dự đoán, nhằm đánh giá khả năng phát triển thành phôi nang của phôi mà mắt người khó quan sát đầy đủ. Dữ liệu đầu vào của hệ thống là chuỗi hình ảnh time-lapse ghi lại toàn bộ quá trình phát triển của phôi từ giai đoạn hợp tử đến các lần phân chia tế bào. Hệ thống tự động theo dõi các thông số hình thái và động học (morphokinetics) của phôi, bao gồm các mốc thời gian phân chia quan trọng như 2 tế bào (t2), 3 tế bào (t3), 4 tế bào (t4), các khoảng thời gian giữa các lần phân chia từ 2 tế bào thành 3 tế bào (P2), khoảng thời gian từ 3 tế bào thành 4 tế bào (P3), số lượng phôi bào vào ngày 3, và các đặc điểm liên quan đến điều kiện sinh học như tuổi noãn tại thời điểm chọc hút. Những thông số này cung cấp thông tin định lượng về chất lượng và tốc độ phát triển của phôi, khó có thể nhận diện bằng mắt thường. Trong giai đoạn huấn luyện, EEVA sử dụng một tập dữ liệu lớn gồm các phôi đã biết kết quả phát triển (có hình thành phôi nang hay không). Mỗi mẫu được gán nhãn (label) theo kết quả thực tế. Dựa trên các thông số động học này, hệ thống xây dựng các mô hình tiên lượng, cho phép học mối liên hệ giữa thời gian phân chia tế bào, số lượng phôi bào và khả năng phát triển thành phôi nang. Thuật toán sử dụng các phương pháp thống kê và học máy truyền thống, tối ưu hóa các trọng số để cải thiện độ chính xác của dự đoán. Khi áp dụng trên dữ liệu phôi mới, EEVA tiến hành phân tích toàn bộ các đặc trưng đã trích xuất từ hình ảnh time-lapse và tính toán xác suất hình thành phôi nang. Kết quả được biểu diễn dưới dạng điểm tiên lượng hoặc phân loại phôi thành các nhóm như cao, trung bình hoặc thấp về tiềm năng phát triển. Thông tin này hỗ trợ chuyên gia phôi học trong việc lựa chọn phôi tốt nhất để chuyển, từ đó nâng cao tỷ lệ thành công của IVF. Tóm lại, cơ chế hoạt động của EEVA có thể được mô tả theo chuỗi xử lý: (1) thu nhận chuỗi hình ảnh phôi, (2) trích xuất các thông số động học, (3) gán nhãn dữ liệu huấn luyện (4) xây dựng mô hình tiên lượng, (5) suy luận trên dữ liệu mới, (6) đưa ra kết quả tiên lượng.

Hệ thống EEVA là hệ thống tự động đầu tiên để phân tích hình ảnh thu được thông qua time-lapse. Công nghệ này là ứng dụng thực tế, tự động hoá của phần mềm trong Lab IVF. Ban đầu, EEVA là một hệ thống hình ảnh tích hợp bên trong tủ nuôi cấy thông thường, ghi lại video time-lapse của sự phát triển phôi bằng cách sử dụng hình ảnh trường tối (Auxogyn, nay là Progyny, Hoa Kỳ). Hệ thống bao gồm một phần mềm thị giác máy tính tự động theo dõi quá trình phân chia phôi từ khi thụ tinh đến ngày thứ 3, dựa trên các phương pháp mô phỏng Monte Carlo (một kỹ thuật toán học dự đoán kết quả có thể xảy ra của một sự kiện không chắc chắn) và nhận biết thời gian phân chia tế bào [64]. Phân tích dữ liệu cho thấy tỷ lệ hình thành phôi nang tăng đáng kể khi ba tham số nằm trong phạm vi tối ưu: P1 (thời gian của chu kỳ tế bào đầu tiên, t2-tPNf), P2 (thời gian của chu kỳ tế bào thứ hai, t3-t2) và P3 (sự đồng bộ của

lần phân chia tế bào thứ hai và thứ ba, t4-t3) [65]. Dựa trên những phát hiện này, phiên bản đầu tiên của hệ thống EEVA đã được xuất bản [44], sử dụng chú thích tự động để cung cấp thuật toán thống kê phân loại chỉ dựa trên hai thời điểm động học hình thái chính: P2 và P3 (P1 không có ý nghĩa thống kê). Thuật toán đó đã phân loại từng phôi ở ngày thứ 3 thành 'cao' hoặc 'thấp' theo khả năng phát triển thành phôi nang. Phiên bản thứ hai của EEVA sử dụng các tham số giống như phiên bản trước nhưng đã thêm một phân loại mới bằng cách chia nhỏ phân loại 'thấp' trước đó thành hai, có khả năng làm tăng tính chọn lọc và cải thiện hiệu quả phân loại phôi [42].

Sau này, hệ thống EEVA tiếp tục được cải thiện với việc phát hành phiên bản mới 2.3 của Merck (Darmstadt, Đức), có thuật toán phân loại mới có tên Xtend®. Trái ngược với các phiên bản cũ, thuật toán mới là một mô hình đa chiều dựa trên bốn tham số chính bao gồm P2, P3, tuổi tế bào noãn và số lượng tế bào ở ngày thứ 3 (vào 68 giờ sau ICSI). Mỗi phôi được đánh giá, chấm điểm từ EEVA 1 (E1: có khả năng tiên lượng cao nhất) đến điểm EEVA 5 (E5: có khả năng tiên lượng thấp nhất), dựa trên khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang. Tiếp theo, hệ thống EEVA phiên bản 3.1 đã được phát triển, tích hợp và hoạt động trong tủ nuôi cấy time-lapse GERI, một phiên bản nâng cao của tủ nuôi cấy time-lapse GERI bao gồm quang học trường tối. Phiên bản này sử dụng thuật toán phân loại giống như phiên bản 2.3, duy trì các tiêu chí đánh giá các tham số và thang điểm từ E1 đến E5.

1.6.3. Phần mềm đánh giá phôi khác được tích hợp vào tủ nuôi cấy time-lapse

Phần mềm đánh giá phôi dựa vào dữ liệu làm tổ đã biết (Known Implantation Data Score - KIDScore). KIDScore D3/D5 là phần mềm đánh giá phôi bán tự động áp dụng cho phôi ngày 3/ngày 5 dự đoán tỷ lệ làm tổ, sử dụng thuật toán KIDScore D3/D5, được tích hợp riêng trong tủ nuôi cấy time-lapse EmbryoScope/ EmbryoScope^{+}. Thuật toán KIDScore được thực hiện bằng phần mềm Embryoviewer (Vitrolife) và được đánh giá bằng cách áp dụng KIDScore D3 (thang điểm liên tục từ 1 đến 5) hoặc KIDScore D5 (thang điểm liên tục từ 1 đến 9,9) theo ngày chuyển phôi. Sử dụng mô hình thuật toán KIDScore D3 dựa trên các phân tích động học hình thái giai đoạn phôi phân chia, mô hình phần mềm sẽ phân loại điểm KIDScore thấp cho những phôi có tiên lượng làm tổ thấp về mặt thống kê và điểm KIDScore cao hơn cho những phôi có tiên lượng làm tổ cao hơn. Mô hình thuật toán KIDScore D5 dựa trên các phân tích một số động học hình thái phôi cả giai đoạn phân chia và giai đoạn phôi nang kết hợp với một số đặc điểm hình thái phôi nang. Phôi có điểm KIDScore D5 càng cao thì tiên lượng làm tổ càng cao [66]. Đây là một phần mềm bán tự động. Các thông số động học hình thái của phôi được nhận biết và chú thích bởi các chuyên viên phôi học kinh nghiệm, sau khi quan sát video về quá trình phát triển của phôi. Video

này được ghi lại bởi một phần mềm máy tính của nhà sản xuất là Embryoviewer.

KIDScore D3 dựa trên sáu chú thích: số lượng tiền nhân bằng 2 (2PN), thời gian từ khi thụ tinh đến khi tiền nhân mờ dần (tPNf), thời gian từ khi thụ tinh đến giai đoạn 2 tế bào (t2), thời gian từ khi thụ tinh đến giai đoạn 3 tế bào (t3), thời gian từ khi thụ tinh đến giai đoạn 5 tế bào (t5), thời gian từ khi thụ tinh đến giai đoạn 8 tế bào (t8). KIDScore D5 dựa trên 8 chú thích [66]: 2PN, t2, t3, t4, t5, thời điểm phôi nang hoàn chỉnh (tB), chất lượng hình thái tế bào ICM (A, B, C) và TE (A, B, C) được đánh giá theo phương pháp đánh giá hình thái phôi nang truyền thống [67].

1.7. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên phần mềm đánh giá phôi, các đặc điểm về động học hình thái, và sự kết hợp của các đặc điểm này

1.7.1. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên các đặc điểm động học

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu nhằm mục tiêu cải thiện kết quả của phòng Lab IVF đang tập trung vào việc tìm kiếm các đặc điểm về chất lượng phôi để bổ sung cho các tiêu chí lựa chọn phôi hiện tại.

Một số mô hình tiên lượng dựa trên các thông số động học hình thái đã được xây dựng nhằm dự báo khả năng tạo phôi nang [68,69], hoặc đánh giá ảnh hưởng tới khả năng phôi mang đặc điểm bất thường lệch bội [6]. Bên cạnh đó, việc dự báo khả năng làm tổ và kết quả thai lâm sàng cũng là một hướng đi tiềm năng. Nhiều nghiên cứu đã đưa ra các mô hình thuật toán để khảo sát tính hữu dụng của các chỉ số động học hình thái của phôi.

Một số thuật toán đã được xây dựng dựa trên kết hợp khả năng dự đoán của các thông số động học riêng lẻ. Một số thuật toán trong số này được xây dựng dựa trên sự kết hợp giữa động học và phân loại hình thái phôi để loại bỏ những phôi có lỗi phân chia tế bào đã biết, chẳng hạn như một số hiện tượng đa nhân, phân chia ngược, phân chia trực tiếp, phân chia hỗn loạn và phân chia tế bào không đồng đều, được xây dựng trong các nghiên cứu trước đây (Bảng **1.4**).

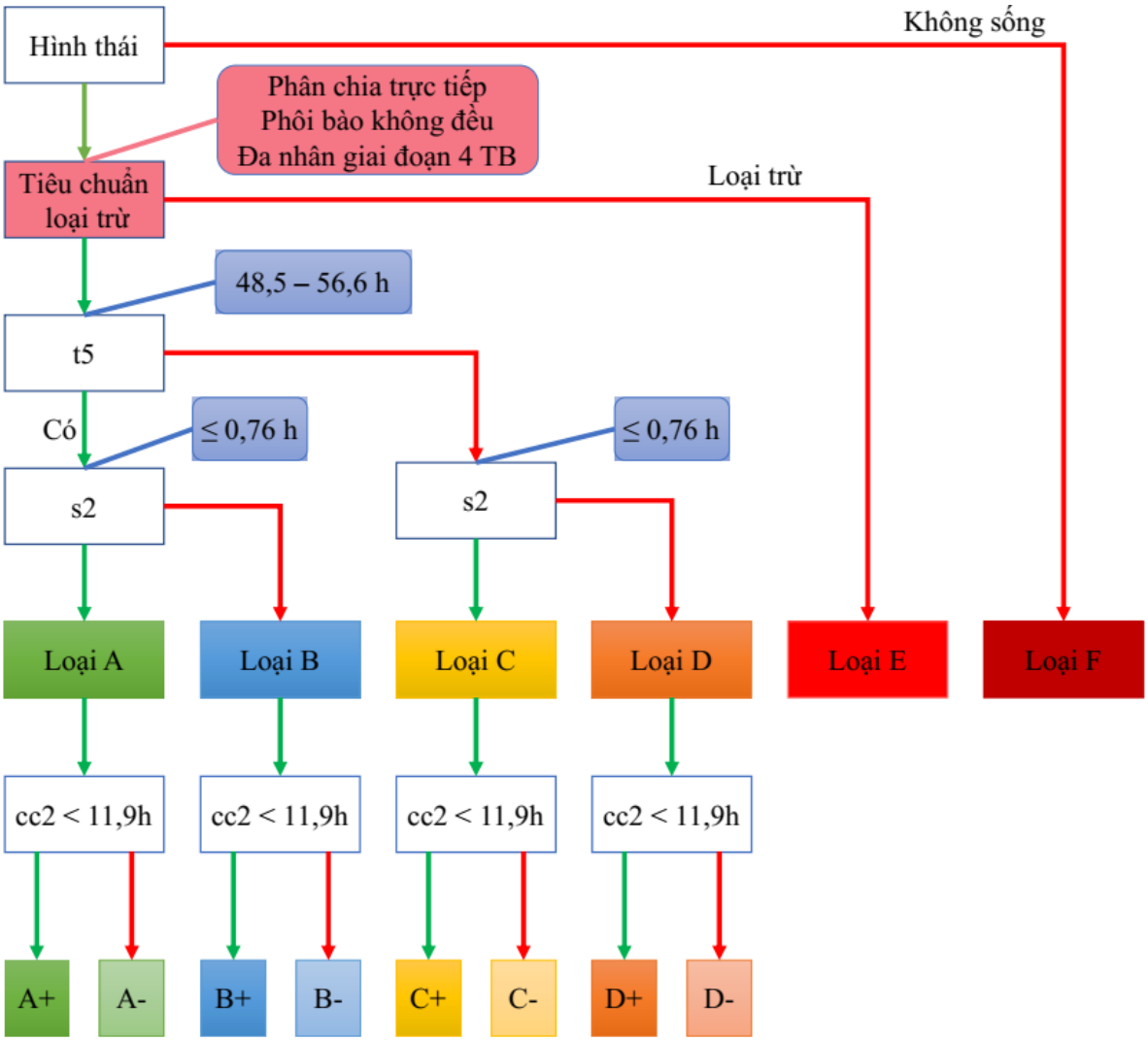
Tuy nhiên, phần lớn các mô hình này vẫn chủ yếu tập trung vào khả năng phân loại hoặc dự báo ở mức nhóm, chưa cung cấp được ước lượng xác suất cá thể hóa có độ tin cậy cao cho từng phôi riêng lẻ trong quyết định lâm sàng. Hơn nữa, theo các tác giả nhận định, hiệu quả của từng mô hình còn phụ thuộc vào quần thể nghiên cứu, điều kiện nuôi cấy và quy trình đánh giá của từng trung tâm, do đó tính khái quát và khả năng áp dụng rộng rãi vẫn cần được tiếp tục kiểm chứng.

Bảng 1.4. Một số nghiên cứu về thuật toán dự báo tỷ lệ làm tổ dựa trên thông số động học hình thái

Tác giả, năm	Số phôi	Thông số động học tiên lượng
Meseguer và cs., 2011 [10]	247	Chọn: t5 (48,8 – 56,6h), t4-t3 (< 0,76h), t3-t2/cc2 (< 11,9h). Loại: phân chia trực tiếp, đa nhân, kích thước không đều giai đoạn 2 tế bào
Azzarello và cs., 2012 [70]	159	tPNf
Aguilar và cs., 2014 [71]	899	tPB2, pha S, tPNf
Athayde Wirka và cs., 2014 [72]	122	Bất thường hòa nhập tiền nhân, và phân bào đầu tiên; phân chia hỗn loạn
VerMilyea và cs., 2014 [42]	331	Cao: P2 9,33 – 11,45h, P3 0 – 1,73h Trung bình P2 9,33 – 12,65h, P3 0,4h
Basile và cs., 2015 [73]	1664	t3 (34 - 40h), t3-t2 (9-12h) và t5 (45 - 55h) Loại: phân chia trực tiếp, đa nhân giai đoạn 4 và kích thước không đều giai đoạn 2 tế bào
Liu và cs., 2015 [74]	270	Hình thái, phân chia bất thường, t5, t4-t3
Adamson và cs., 2016 [14]	319	P2 9,33 – 11,45h và P3 0 – 1,73h Loại: Phân chia trực tiếp
Goodman và cs., 2016 (RCT) [75]	235	Điểm trừ: cc2 < 5h (-1), đa nhân (- 0,5), phân chia bất thường (-0,5) Điểm cộng: t5 45,8 – 57,0 (+1), s2 0 – 0,1h (+1), s3 1,4 – 7,0 (+1), tSB < 100 (+1)
Petersen và cs., 2016 [11]	11218	t3-tPNf, t5-t3/t3-t2
Yang và cs., 2018 (RCT) [76]	600	Phân chia bất thường
Fishel và cs., 2018 [77]	781	tSB, tB-tSB
Kovacs và cs., 2019 (RCT) [78]	161	cc1, cc2, lần phân bào đầu tiên, s2, t5, độ phân mảnh, không bào

Rất nhiều nghiên cứu quan sát đã đưa ra các mốc thời gian và khoảng thời gian khác nhau. Mô hình đầu tiên được Meseguer và cộng sự đưa ra vào năm 2011 [10], nghiên cứu về các chỉ số liên quan tới tiềm năng làm tổ trên 247 phôi và phát triển một mô hình phân cấp chia thành 6 loại từ A đến F. Bốn trong số đó (A - D) lại được chia thành các bậc phụ (+) hoặc (-). Quy trình phân loại thứ bậc bao gồm đánh giá hình thái ban đầu để loại bỏ những phôi xấu xếp loại F (bất thường nặng, thoái hóa hoặc ngừng phát triển). Tiếp theo là loại trừ các phôi có một trong ba tiêu chí sau: (i)

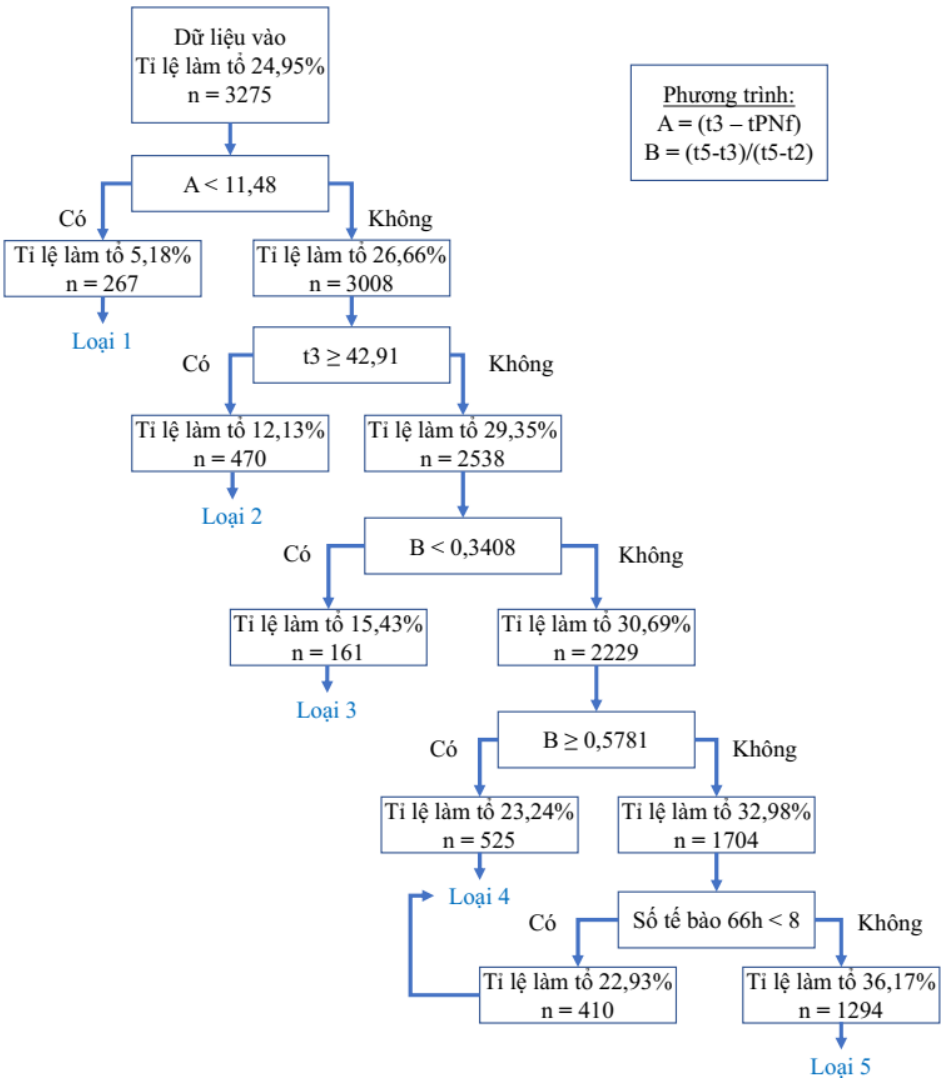
kích thước phôi bào không đồng đều ở giai đoạn 2 tế bào, (ii) phân chia trực tiếp từ một thành ba tế bào hoặc nhiều hơn; hoặc (iii) đa nhân ở giai đoạn 4 tế bào (loại E). Các bậc tiếp theo của mô hình dựa trên thời gian t5, s2 và cc2. Nếu t5 trong khoảng tối ưu (48,8 - 56,6 giờ), phôi được xếp loại A hoặc B. Nếu t5 ngoài khoảng tối ưu, phôi được xếp loại C hoặc D. Nếu s2 trong khoảng tối ưu (≤ 0,76 giờ), phôi được xếp loại A hoặc C dựa vào t5; tương tự nếu s2 ngoài khoảng tối ưu sẽ là loại B hoặc D. Cuối cùng, phôi sẽ được xếp loại (+) nếu giá trị cc2 ≤ 11,9 giờ và (-) nếu ngoài khoảng giới hạn đó (Hình **1.10**). Phân tích đường cong ROC (receiver operating characteristic curve) để xác định khả năng dự báo của mô hình cho thấy giá trị diện tích dưới đường cong (area under the curve, AUC) đạt 0,72 (CI 95% 0,645 - 0,795).



Hình 1.10. Mô hình lựa chọn phôi của Meseguer [10]

TB: tế bào, t5: thời gian phôi phân chia thành 5 tế bào, cc2: khoảng thời gian phân chia của từng tế bào trong một chu kỳ phân bào, s2: sự đồng bộ của lần phân chia tế bào thứ 2, h: thời gian là giờ được tính từ lúc tiêm tinh trùng vào bào tương noãn. (Mũi tên màu xanh: có đặc điểm mô tả; mũi tên màu đỏ: không có đặc điểm mô tả).

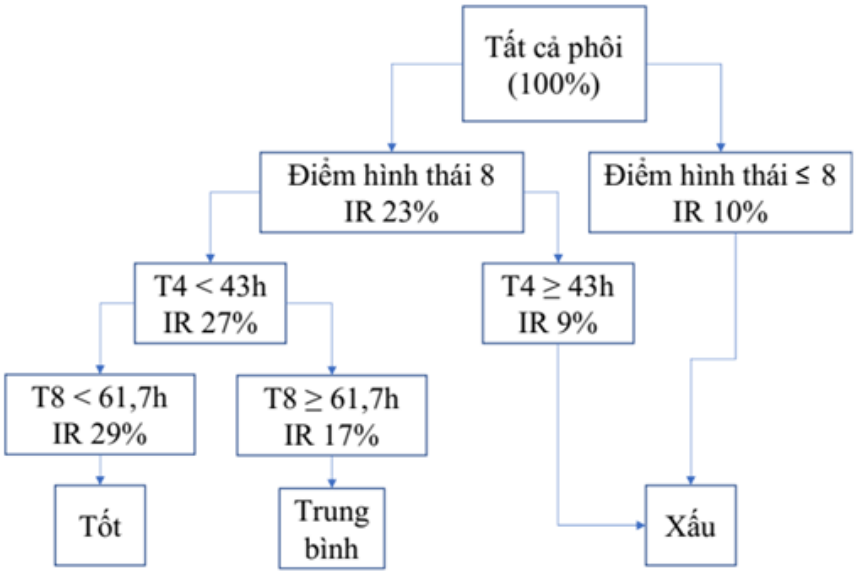
Năm 2016, Petersen và cộng sự [11] đưa ra mô hình phân loại dạng cây dựa trên các thông số động học của phôi đến ngày 3. Nghiên cứu được thực hiện trên quy mô đa trung tâm với 3275 phôi chuyển ngày 3 tại 24 trung tâm. Dữ liệu thu thập từ các trung tâm trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (nồng độ oxy 5% hoặc 20%, đa dạng môi trường nuôi cấy) và các phương pháp thụ tinh khác nhau (IVF cổ điển hoặc ICSI). Tác giả đưa ra kết quả các thông số ảnh hưởng và được đưa vào mô hình bao gồm tPNf, t2, t3, t5 và t8, các thông số động học này đã được định nghĩa trong Bảng **1.2**. Trong đó chỉ t3 và t8 là thông số được sử dụng trực tiếp, còn các thông số khác được tính toán chuyển đổi thành các khoảng thời gian hoặc phương trình tỷ lệ. Mô hình phân loại phôi thành 5 cấp độ (từ 1 đến 5) với tỷ lệ làm tổ tăng dần (Hình **1.11**). Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của các thông số động học trong hỗ trợ lựa chọn phôi, song vẫn cần được kiểm chứng thêm trên các quần thể độc lập.



Hình 1.11. Mô hình lựa chọn phôi của Petersen [11]

Động học phát triển của phôi trong mô hình bao gồm t2, t3, t5: thời gian xuất hiện 2, 3, 5 tế bào, tPNf: thời gian tiền nhân biến mất, n: số lượng phôi chuyển

Tác giả cũng thực hiện kiểm định lại độ mạnh của các tham số trong mô hình bằng cách chia ngẫu nhiên bộ số liệu thành 5 phần và thực hiện xây dựng - kiểm định trên mỗi bộ 1 - 4 phần của dữ liệu. Kết quả cho thấy AUC sau hiệu chỉnh của 5 lần kiểm định không có sự khác biệt đáng kể (0,640 - 0,648). Từ đó tác giả đánh giá rằng mô hình này có thể có hiệu quả trên nhiều điều kiện khác nhau.



Hình 1.12. Mô hình lựa chọn của Carrasco [12]

(IR: Tỷ lệ làm tổ, Tn: thời gian phôi phân chia n tế bào, h: thời gian tính bằng giờ)

Năm 2017, tác giả Carrasco và cộng sự [12] xây dựng một mô hình cây dự báo dựa trên số liệu của 800 phôi chuyển ngày 3. Tác giả phân tích các chỉ số từ giai đoạn thụ tinh đến hết ngày 3 và kết hợp với đánh giá phôi truyền thống. Kết quả cho thấy thông số đặc điểm hình thái theo đánh giá phân độ truyền thống cũng đóng góp là một thành phần của mô hình. Dựa trên số liệu thu thập được, tác giả đưa ra mô hình cây với nhánh rẽ đầu tiên là điểm chất lượng hình thái (≥ 8), tiếp theo xét đến ngưỡng tối ưu của thông số t4 (43 giờ) và t8 (< 61,7 giờ), từ đó phân ra thành ba nhóm Tốt - Trung bình - Xấu với tỷ lệ làm tổ lần lượt là 29%, 17% và 9% (Hình **1.12**). Như vậy mô hình đã giúp dự báo tiềm năng làm tổ khác nhau của các phôi có cùng đặc điểm chất lượng hình thái theo đánh giá truyền thống. Hạn chế của mô hình cây là không cho phép xác định hoặc định lượng tầm quan trọng của mỗi biến trong mô hình hoặc tính toán tỷ số chênh cho mỗi tham số như mô hình hồi quy logistic. Tuy nhiên ưu điểm của mô hình cây là có thể được áp dụng một cách tương đối trực quan hơn, song cần thực hiện một cách thận trọng. Tác giả kết luận rằng mặc dù hình thái phôi theo đánh giá truyền thống vẫn đóng một vai trò quan trọng ngay cả trong mô hình cây, tuy nhiên các tham số động học hình thái có thể giúp phân biệt những phôi có tiềm năng làm tổ tốt nhất trong số đó, từ đó góp phần cải thiện kết quả lâm sàng.

Năm 2017, Barrie và cộng sự [13] thực hiện đánh giá hiệu quả của sáu mô hình khác nhau trên cùng một bộ dữ liệu với 977 phôi của 884 bệnh nhân. Kết quả cho thấy cả 6 mô hình đều giảm khả năng dự báo khi áp dụng vào một bộ số liệu mới, với AUC, giá trị dự báo dương tính (PPV) đều thấp (< 0,65 và < 45%). Bên cạnh đó có sự dao động khá lớn về giá trị PPV (38 - 44%), giá trị dự báo âm tính (NPV) (61 - 77%) và AUC (0,52 - 0,63) giữa các mô hình. Độ nhạy và độ đặc hiệu của mỗi mô hình cũng có sự khác biệt đáng kể. Tác giả cho rằng một trong những nguyên nhân quan trọng nhất dẫn đến sự khác biệt giữa các nghiên cứu là điều kiện nuôi cấy không đồng nhất, bao gồm việc sử dụng môi trường nuôi cấy liên tục hay chuyển tiếp, cũng như sự khác biệt về nồng độ khí CO_2 và O_2. Các mô hình được xây dựng từ dữ liệu đa trung tâm có xu hướng có tính khái quát cao hơn. Tuy nhiên, nếu không kiểm soát các yếu tố như sử dụng noãn hiến, kết quả có thể bị sai lệch khi đánh giá tiềm năng làm tổ của phôi. Ngoài ra, sự khác biệt về phác đồ kích thích buồng trứng, nguyên nhân vô sinh, tỷ lệ hội chứng buồng trứng đa nang, phương pháp thụ tinh, chiến lược lựa chọn và chuyển phôi, cũng như tỷ lệ làm tổ trong quần thể nghiên cứu, đều có thể ảnh hưởng đến hiệu năng mô hình một cách đáng kể trong thực hành lâm sàng.

Bên cạnh đó, các yếu tố kỹ thuật trong ghi nhận và phân tích động học hình thái như số mặt phẳng tiêu điểm, chất lượng hình ảnh, cũng như sự không thống nhất trong định nghĩa các mốc thời gian (đặc biệt là thời điểm t0) cũng góp phần tạo ra sai khác đáng kể nhất định giữa các nghiên cứu. Những khác biệt này làm hạn chế khả năng so sánh trực tiếp giữa các mô hình và ảnh hưởng đến tính tái lập khi áp dụng trong thực hành lâm sàng. Do đó, việc chuẩn hóa quy trình nuôi cấy, thu thập và phân tích dữ liệu là yêu cầu cần thiết khi xây dựng hoặc triển khai mô hình tại một cơ sở mới. Đồng thời, cần thận trọng khi ngoại suy kết quả từ các nghiên cứu khác sang quần thể bệnh nhân cụ thể của từng trung tâm nhằm đảm bảo độ chính xác cao hơn.

Có thể thấy nhiều nghiên cứu về mô hình tiên lượng đã tập trung vào các thông số động học đến giai đoạn phân chia của phôi. Tuy nhiên do sự khác nhau về nhiều đặc điểm giữa các phòng Lab, các trung tâm về điều kiện, chiến lược nuôi cấy phôi, chuyển phôi, đặc điểm bệnh nhân đặc trưng, dẫn đến có thể còn tồn tại nhiều yếu tố nhiễu, nên khả năng tiên lượng còn chưa được cao. Do đó, khả năng khái quát và áp dụng rộng rãi của các mô hình này còn hạn chế khi triển khai ở các trung tâm khác nhau. Bên cạnh đó, việc thiếu các nghiên cứu ngoại kiểm độc lập làm giảm độ tin cậy của các mô hình trong thực hành lâm sàng. Vì vậy, cần thiết phải xây dựng và hiệu chỉnh các mô hình tiên lượng dựa trên dữ liệu đặc thù của từng trung tâm nhằm nâng cao độ chính xác và tính ứng dụng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản hiện nay.

1.7.2. Các nghiên cứu về mô hình tiên lượng dựa trên sự kết hợp phần mềm đánh giá phôi, thông số động học, hình thái.

Năm 2016, Adamson và các cộng sự [14] thực hiện nghiên cứu nhằm so sánh 2 mô hình chọn phôi chuyển ngày 3 nhằm tiên lượng tỷ lệ làm tổ. Mô hình 1 là sự kết hợp giữa phần mềm đánh giá phôi EEVA và đánh giá hình thái truyền thống phôi ngày 3. Mô hình 2 là chỉ sử dụng đánh giá hình thái truyền thống phôi ngày 3. Trong nghiên cứu này, phôi chuyển được chọn theo mô hình 1 cho tỷ lệ làm tổ cao hơn so với phôi chuyển được chọn theo mô hình 2 (30,2% và 19,0%, p = 0,003). Tuy nhiên nghiên cứu có hạn chế là sử dụng loại đĩa nuôi cấy khác nhau ở 2 mô hình, sử dụng phương pháp thụ tinh khác nhau trong nghiên cứu (IVF cổ điển hoặc ICSI), khác nhau về nguyên nhân vô sinh. Một số mô hình không loại trừ các yếu tố gây nhiễu dẫn đến có thể mô hình không được tối ưu kết quả khi tập trung vào đặc điểm của phôi với tiềm năng làm tổ và chỉ có thể áp dụng được trong điều kiện của chính trung tâm đó.

Năm 2023, Valera và các cộng sự [9] đã xây dựng mô hình tiên lượng để dự đoán tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ trẻ sinh sống sử dụng thuật toán học máy - hồi quy logistic với phương pháp phương trình ước tính tổng quát (GEE). Đây là một nghiên cứu hồi cứu thuần tập, được thực hiện tại một trung tâm. Mô hình xây dựng được dựa trên 837 chu kỳ chuyển phôi nang đã biết kết quả làm tổ. Dữ liệu thu thập có sự kết hợp từ các điều kiện tủ nuôi cấy (tủ nuôi cấy 3 khí riêng hoặc tủ nuôi cấy khí trộn, hệ thống nuôi khô hoặc hệ thống nuôi ẩm, nồng độ oxy 5% hoặc 20%, môi trường nuôi cấy chuyển tiếp hoặc môi trường nuôi cấy liên tục, thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau, loại đĩa khác nhau), các loại chu kỳ chuyển phôi (chuyển phôi chu kỳ rã đông hoặc chuyển phôi tươi, phôi từ chu kỳ noãn hiến hoặc phôi từ chu kỳ sàng lọc trước làm tổ tự thân, PGT-A), số lượng phôi chuyển (1 phôi hoặc 2 phôi), phần mềm đánh giá phôi phiên bản khác nhau (EEVA 2.3 hoặc EEVA 3.0), có tích hợp vào tủ nuôi cấy hoặc phần mềm tách biệt với tủ nuôi cấy. Tác giả xây dựng 3 mô hình, mô hình thứ nhất (1) bao gồm yếu tố tiên lượng là phần mềm EEVA và các thông số gây nhiễu, được đưa vào mô hình bao gồm loại tủ nuôi cấy, loại chu kỳ chọc hút, loại chu kỳ chuyển phôi, tuổi phôi chuyển, tuổi noãn, BMI người cung cấp noãn (mô hình tiên lượng EEVA); mô hình thứ hai (2) bao gồm yếu tố tiên lượng là hệ thống phân loại hình thái truyền thống phôi nang (hệ thống phân loại ASEBIR) thay phần mềm EEVA và các thông số gây nhiễu như trong mô hình 1 (mô hình tiên lượng hình thái); mô hình thứ ba (3) bao gồm kết hợp cả hai yếu tố tiên lượng là phần mềm EEVA và hệ thống phân loại hình thái phôi nang truyền thống (hệ thống phân loại ASEBIR) cùng các yếu tố gây nhiễu (mô hình tiên lượng kết hợp EEVA và hình thái). Ngoài ra tác giả cũng xây dựng thêm mô hình tiên lượng GEE để dự đoán kết quả làm tổ cho riêng

nhóm nhỏ (trên chu kỳ noãn hiến và trên chu kỳ PGT-A tự thân). Kết quả cho thấy cả 3 mô hình có khả năng tiên lượng tỷ lệ làm tổ, tuy nhiên khả năng tiên lượng còn thấp, với AUC lần lượt là 0,61; 0,61; 0,63. Tác giả nhận xét nguyên nhân quan trọng thiết kế nghiên cứu chưa được tối ưu, có nhiều yếu tố gây nhiễu ảnh hưởng đến mô hình có thể xuất phát từ điều kiện nuôi cấy khác nhau trong nghiên cứu, bao gồm loại khí khác nhau (3 khí riêng và khí trộn), hệ thống nuôi ẩm và hệ thống nuôi khô, môi trường nuôi cấy chuyển tiếp và nuôi cấy liên tục, khác biệt về nồng độ CO_2 và O_2. Một số mô hình không loại trừ các trường hợp noãn hiến, phôi sàng lọc sẽ dẫn đến có thể làm sai lệch, ảnh hưởng đến kết quả làm tổ. Bên cạnh đó hiệu quả và sự sai lệch giữa các mô hình còn có thể đến từ sự khác biệt giữa các hệ thống đánh giá phôi (khác nhau về định nghĩa về chất lượng hình thái phôi, yếu tố chủ quan trong cách đánh giá giữa các nhà phôi học). Ngoài ra, sự khác nhau giữa các phiên bản trong cùng một hệ thống phần mềm cũng khác nhau về khả năng tiên lượng. Trong một nghiên cứu xác thực về phần mềm của EEVA, Vermilyea và các cộng sự (2014) [42] cũng đã chỉ ra rằng phiên bản EEVA sau đã được chứng minh có cải thiện khả năng tiên lượng so với EEVA phiên bản đầu. Đây là các vấn đề cơ bản cần quan tâm và xây dựng hoặc áp dụng mô hình tại một cơ sở, trung tâm mới.

Năm 2022, Bori và cộng sự [79] đã nghiên cứu tiến hành đánh giá hiệu quả của một mô hình tiên lượng KIDScore D5 v3 (phiên bản 3). Mô hình được xây dựng dựa trên sự phát triển của một phần mềm đánh giá phôi KIDScore D3 kết hợp thêm với một thông số động học phôi nang tB (thời gian tạo phôi nang hoàn chỉnh) và chất lượng hình thái tế bào ICM, chất lượng hình thái tế bào TE được đánh giá theo hệ thống đánh giá hình thái truyền thống phôi nang (hệ thống ASEBIR). Tác giả sử dụng mô hình hồi quy logistic đánh giá hiệu quả của mô hình KIDScore D5 v3, cùng với phân tích đa biến, các yếu tố gây nhiễu bao gồm nguồn gốc noãn (noãn hiến hay noãn tự thân), sàng lọc phôi trước làm tổ PGT-A (có sàng lọc hoặc không sàng lọc), loại chu kỳ chuyển phôi (phôi chu kỳ rã đông hoặc chu kỳ tươi), tuổi noãn, BMI người cung cấp noãn, tuổi phôi (ngày 5 hoặc ngày 6), chiến lược nuôi phôi (nuôi đơn hoặc nuôi nhóm), nguyên nhân vô sinh (vô sinh nam, hoặc vô sinh nữ, hoặc cả 2, hoặc do yếu tố xã hội, hoặc không rõ nguyên nhân). Kết quả cho thấy có khả năng tiên lượng còn thấp với AUC là 0,633. Theo tác giả nhận xét nguyên nhân có thể xuất phát từ các yếu tố gây nhiễu tác giả đã nêu ra. Với kết cục là tỷ lệ làm tổ, các trường hợp sử dụng phôi từ nguồn gốc noãn hiến, phôi được sàng lọc PGT-A có thể làm ảnh hưởng đến kết cục. Đặc biệt với chu kỳ chuyển phôi rã đông, chất lượng phôi thay đổi sau rã đông, phôi giảm chất lượng, phôi thoái hóa ảnh hưởng lớn tới kết quả làm tổ. Các đặc điểm khác như phác đồ kích trứng, tỷ lệ nguyên nhân vô sinh cũng có thể ảnh

hưởng tới kết quả lâm sàng khi áp dụng trên các quần thể bệnh nhân khác nhau.

Nhìn chung, nhiều mô hình tiên lượng đã được phát triển dựa trên sự kết hợp giữa phần mềm đánh giá, thông số động học hình thái và hình thái phôi, áp dụng cho phôi giai đoạn phân chia, phôi ngày 3 hoặc phôi nang. Tuy nhiên, do khác biệt về điều kiện phòng Lab, chiến lược nuôi cấy và chuyển phôi, cũng như đặc điểm bệnh nhân, các yếu tố nhiễu vẫn tồn tại, làm giảm độ chính xác dự báo. Cho đến nay, chưa có mô hình nào đủ hiệu quả để áp dụng rộng rãi trong mọi phòng lab và trung tâm IVF. Dù vậy, việc phân tích thêm các đặc điểm động học hình thái và kết hợp phần mềm đánh giá với phương pháp đánh giá hình thái truyền thống có thể cung cấp thông tin bổ sung, nâng cao hiệu quả lựa chọn phôi. Do đó, việc xây dựng các phương pháp thẩm định trước khi áp dụng lâm sàng là rất quan trọng và cần được nghiên cứu thêm.

1.7.3. Các nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu đã thực hiện đánh giá ảnh hưởng của các thông số động học hình thái giai đoạn phôi phân chia tới khả năng phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang, kết quả lệch bội của phôi. Tuy nhiên không có nhiều nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các thông số động học và tiềm năng làm tổ của phôi.

Năm 2021, nhóm tác giả Nguyễn Thụy Trà My và cộng sự có đưa ra báo cáo xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ dựa vào thông số động học của 331 phôi chuyển ở giai đoạn phân chia. Kết quả phân tích cho thấy thông số t5 (thời gian phôi đạt 5 tế bào) có mức độ ảnh hưởng nhiều nhất và được chọn để đưa vào xây dựng mô hình tiên lượng. Tác giả chia mẫu thành các tứ phân vị để tìm ra ngưỡng cắt tối ưu của thông số t5 là trong khoảng từ 44,37 - 52,96 (giờ). Tuy nhiên mô hình tiên lượng dựa trên chỉ một thông số t5 cho hiệu quả còn khá thấp (AUC = 0,511) [17].

Năm 2023, tác giả Phí Thị Tú Anh và các cộng sự [18] đã tiến hành xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi nang chu kỳ chuyển phôi rã đông dựa vào một số thông số động học hình thái của phôi giai đoạn phôi phân chia. Đây là một nghiên cứu thuần tập hồi cứu trên 383 phôi nang tốt sau rã đông của các chu kỳ chuyển phôi, đã biết kết quả làm tổ. Mô hình tiên lượng khả năng làm tổ được xây dựng bằng thuật toán cây phân loại. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mô hình thứ bậc gồm các thông số phân chia trực tiếp, thời gian tiền nhân xuất hiện (tPNa) và thời gian từ khi tiền nhân biến mất đến khi phân chia 2 tế bào (cc1) cho thấy có ý nghĩa tiên lượng đến tiềm năng làm tổ của phôi nhất. Tuy nhiên giá trị tiên lượng của mô hình còn thấp, với giá trị AUC = 0,641. Theo tác giả nghiên cứu còn một số hạn chế như các phôi được chọn trong nghiên cứu là phôi có chất lượng hình thái tốt, đã biết kết quả làm tổ, của nhóm bệnh nhân có tiên lượng tốt, nên mô hình chưa có tính khái

quát khi áp dụng trên một quần thể mới. Mô hình chỉ được nội kiểm từ bộ dữ liệu xây dựng, do đó kết quả của mô hình cần được kiểm định lại bằng các thử nghiệm lâm sàng tiến cứu và trên một bộ dữ liệu mới để đảm bảo tính phù hợp rộng rãi hơn.

Như vậy, hiện nay các mô hình tiên lượng dựa trên thông số động học hình thái vẫn còn nhiều hạn chế, thể hiện ở giá trị dự đoán chưa cao với độ nhạy, độ đặc hiệu và AUC còn thấp. Phần lớn các mô hình trước đây chỉ được nội kiểm, chưa được xác thực trên các quần thể độc lập. Nhiều mô hình đạt hiệu quả tốt trong nghiên cứu ban đầu nhưng không thể tái lập khi áp dụng trên bộ dữ liệu khác hoặc tại trung tâm khác. Ngoài ra, hầu hết các nghiên cứu chưa kiểm soát đầy đủ các yếu tố nhiễu. Theo hướng dẫn của ESHRE (2020), các yếu tố này có thể xuất phát từ đặc điểm bệnh nhân (tuổi, loại vô sinh, tình trạng béo phì, phác đồ kích thích buồng trứng, dự trữ buồng trứng, hút thuốc), đặc điểm giao tử và phôi (bất thường tinh trùng, noãn, phương pháp thụ tinh, đông lạnh, sinh thiết), cũng như điều kiện nuôi cấy và đánh giá đặc thù của từng phòng Lab [4]. Do các mô hình thường được phát triển trong điều kiện cụ thể của từng cơ sở, khả năng khái quát hóa khi áp dụng sang trung tâm khác thường bị suy giảm. Vì vậy, mặc dù các mô hình tiên lượng là công cụ đầy hứa hẹn trong lựa chọn phôi, song việc áp dụng cần được cân nhắc thận trọng, phù hợp với điều kiện và chiến lược phát triển của từng trung tâm IVF riêng biệt. Ở Việt Nam, mới chỉ có một nghiên cứu xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ, dựa trên động học phôi giai đoạn phân chia, nhưng hiệu quả còn hạn chế (AUC = 0,64) [18].

Trên cơ sở đó, tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu xác định mối liên quan giữa phần mềm đánh giá phôi EEVA, một số thông số động học hình thái, hình thái học của phôi giai đoạn phôi nang với khả năng làm tổ của phôi nang và xây dựng mô hình tiên lượng làm tổ dựa trên sự kết hợp các thông số này. Nghiên cứu tập trung khai thác dữ liệu time-lapse nhằm cải thiện độ chính xác dự báo. Đồng thời hướng đến tăng tính ứng dụng của mô hình trong thực hành IVF. Đặc biệt chú trọng đến giai đoạn phôi nang là giai đoạn quyết định làm tổ. Kết quả kỳ vọng góp phần tối ưu lựa chọn phôi chuyển đơn. Qua đó nâng cao hiệu quả điều trị hỗ trợ sinh sản một cách rõ rệt hơn.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Hà Nội.

2.1.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian tiến hành nghiên cứu từ tháng 5 năm 2023 đến tháng 12 năm 2025.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu gồm 2 quần thể:

Quần thể 1 - Đánh giá mối liên quan giữa EEVA và hình thái phôi nang: Gồm 2522 phôi được tạo ra từ 291 chu kỳ ICSI, nuôi cấy đến ngày 5 hoặc ngày 6 bằng hệ thống tủ nuôi cấy time-lapse GERI tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh. Quần thể này được sử dụng để đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và khả năng hình thành, chất lượng hình thái phôi nang.

Quần thể 2 - Xây dựng mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi: Gồm 511 phôi nang được chuyển trong 511 chu kỳ chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông từ tháng 3/2020 đến hết tháng 12/2023 tại Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ. Trong đó, 320 bệnh nhân có 1 chu kỳ chuyển phôi, 80 bệnh nhân có 2 chu kỳ, 9 bệnh nhân có 3 chu kỳ, 1 bệnh nhân có 4 chu kỳ. Tổng số 410 bệnh nhân khác nhau tạo ra 511 chu kỳ chuyển phôi.

Trong một chu kỳ ICSI, nhiều phôi có thể được tạo ra và các phôi chưa sử dụng sẽ được bảo quản lạnh. Do đó, nếu còn phôi trữ, bệnh nhân có thể trải qua nhiều chu kỳ chuyển phôi mà không cần thực hiện lại ICSI, và các phôi được chuyển ở những chu kỳ khác nhau có thể cùng có nguồn gốc từ một chu kỳ ICSI.

2.2.2. Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân có chỉ định nuôi phôi nang ở tủ time-lapse GERI kết hợp với EEVA
- Mỗi chu kỳ chuyển một phôi nang đông lạnh, biết kết quả làm tổ.
- Chất lượng phôi nang sau rã không giảm.
- Niêm mạc tử cung (NMTC) trước chuyển phôi > 7 mm vào thời điểm chuyển dạng niêm mạc (theo nghiên cứu phân tích cộng gộp của Kasius và cộng sự [80], nếu NMTC trước chuyển phôi ≤ 7mm tỷ lệ thai lâm sàng giảm đáng kể).
- Không có bất thường về buồng tử cung. Không có bệnh lý tử cung và vòi tử cung đi kèm (lạc nội mạc tử cung, u xơ cơ tử cung, ứ dịch vòi tử cung, dính

buồng tử cung, ứ dịch vết mổ, dị dạng buồng tử cung, polyp buồng tử cung).

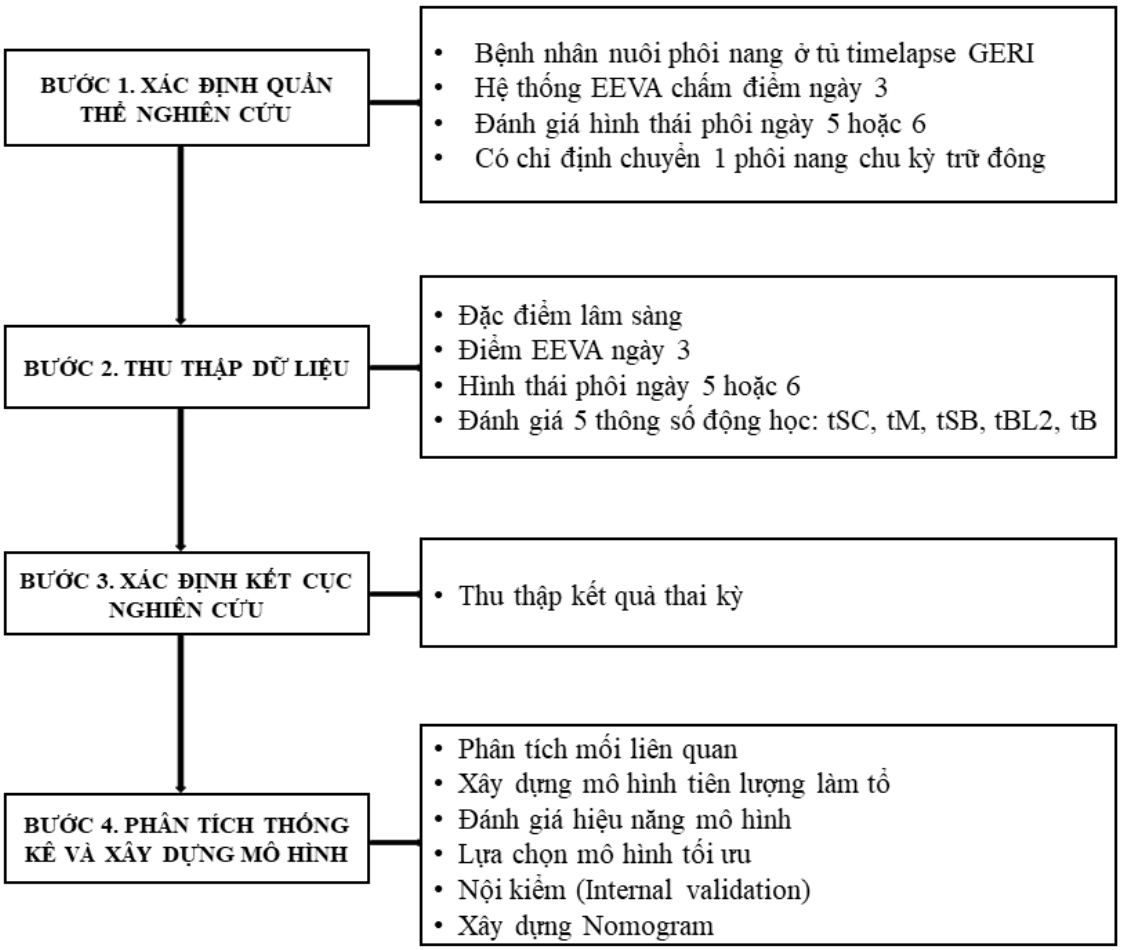
- Đủ thông tin phục vụ cho nghiên cứu.

2.2.3. Tiêu chuẩn loại trừ

- Xin cho noãn, mang thai hộ.
- Tinh trùng bất thường nặng, tinh trùng thu từ phẫu thuật.
- Phôi bị thoái hóa hoặc giảm chất lượng sau rã đông.
- Phôi đã làm xét nghiệm di truyền tiền làm tổ PGT.

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện theo thiết kế thuần tập hồi cứu (retrospective cohort study), với quy trình các bước như sơ đồ nghiên cứu sau (Hình **2.1**):



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt quy trình nghiên cứu

Hình **2.1** thể hiện sơ đồ tóm tắt quy trình nghiên cứu, cụ thể gồm các bước sau:

Bước 1: Xác định quần thể nghiên cứu:

Rà soát các bệnh nhân có phôi được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang (ngày 5 hoặc ngày 6) trong tủ time-lapse GERI. Mỗi phôi được chấm điểm EEVA ở ngày 3

và đánh giá chất lượng phôi nang theo hình thái truyền thống ở ngày 5 hoặc ngày 6. Từ quần thể này, rà soát cơ sở dữ liệu, thu thập tất cả các chu kỳ chuyển một phôi nang đông lạnh - rã đông từ tháng 3/2020 đến hết tháng 12/2023 để phân tích kết quả thai kỳ và xây dựng mô hình. Các trường hợp được đưa vào nghiên cứu khi đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và không vi phạm tiêu chuẩn loại trừ.

Bước 2: Thu thập dữ liệu đặc điểm lâm sàng và thông số phôi:

Thu thập hồi cứu các thông tin lâm sàng của bệnh nhân (khai thác từ hồ sơ bệnh án của mỗi bệnh nhân), điểm EEVA ngày 3 và chất lượng hình thái ngày 5 hoặc ngày 6 của phôi chuyển.

Đồng thời, xem lại và phân tích video time-lapse của từng phôi từ tủ nuôi cấy để trích xuất 5 thông số động học hình thái của phôi bao gồm: tSC (thời gian phôi bắt đầu nén), tM (thời gian phôi kết thúc quá trình nén), tSB (thời gian phôi bắt đầu tạo khoang), tBL2 (thời gian khoang phôi nang đạt ½ thể tích phôi), tB (thời gian khoang phôi nang đầy), làm biến đầu vào để xây dựng mô hình tiên lượng kết quả làm tổ.

Bước 3: Xác định kết cục nghiên cứu:

Nghiên cứu viên thu thập thông tin về kết quả thai kỳ của các chu kỳ chuyển phôi từ hệ thống quản lý dữ liệu và báo cáo kết quả điều trị của Trung tâm Hỗ trợ sinh sản. Nghiên cứu viên rà soát, đối chiếu và trích xuất dữ liệu kết quả thai kỳ từ hồ sơ bệnh án điện tử của bệnh nhân đã được theo dõi tại trung tâm. Đối với các trường hợp không theo dõi thai kỳ tại trung tâm, nghiên cứu viên thu thập kết quả từ hệ thống dữ liệu do bộ phận tổng đài của trung tâm cập nhật định kỳ hàng tháng sau khi liên hệ với người bệnh và kiểm tra tính đầy đủ, nhất quán của dữ liệu trước khi đưa vào phân tích.

Bước 4: Phân tích thống kê và xây dựng mô hình:

Đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA ngày 3 và kết quả phôi nang. Đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA, đặc điểm hình thái và các thông số động học với kết quả thai kỳ khi chuyển phôi nang. Dựa vào điểm EEVA, đánh giá hình thái phôi nang, thông số động học phôi nang với kết quả thai kỳ của chuyển phôi nang để xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi. Đánh giá độ phù hợp của các mô hình. Lựa chọn một mô hình tối ưu nhất. Tiến hành nội kiểm mô hình lựa chọn. Xây dựng nomogram trực quan hóa mối liên quan giữa các biến và khả năng làm tổ.

2.4. Phương pháp chọn mẫu

Chọn mẫu thuận tiện theo trình tự thời gian, gồm các bước sau:

Bước 1: Trích xuất dữ liệu từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Hỗ trợ sinh sản,

Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh đối với các chu kỳ điều trị trong thời gian từ tháng 3/2020 đến tháng 12/2023.

Bước 2: Rà soát hồ sơ và sàng lọc các chu kỳ theo tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ của nghiên cứu đã được xác định trước.

Bước 3: Lựa chọn các chu kỳ đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn nghiên cứu và thu thập các thông tin cần thiết, bao gồm dữ liệu nuôi cấy phôi bằng hệ thống time-lapse GERI và kết quả của các chu kỳ chuyển một phôi đông lạnh.

Bước 4. Đưa các chu kỳ đủ điều kiện vào nghiên cứu cho đến khi đạt cỡ mẫu theo thiết kế nghiên cứu.

2.5. Phương pháp xác định cỡ mẫu

2.5.1. Cỡ mẫu tối thiểu cho các phân tích mô tả bổ sung

Để so sánh hai nhóm độc lập (có thai hoặc không có thai) về động học hình thái phôi:

Cỡ mẫu cho so sánh giữa hai nhóm độc lập được tính bằng phần mềm G*Power 3.1, với kiểm định Mann-Whitney U (phi tham số tương đương kiểm định t cho hai mẫu độc lập), mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, công suất kiểm định (power) = 0,8. Hiệu quả tác động trung bình theo Cohen (effect size d = 0,5). Kết quả: tối thiểu 64 phôi cho mỗi nhóm, tương đương tổng cộng 128 phôi. Cộng thêm 20% dự phòng mất mẫu, cỡ mẫu ước tính là khoảng 154 phôi cho hai nhóm (77 phôi cho mỗi nhóm) [81].

Để so sánh ba nhóm độc lập gồm ICM (A, B, C), TE (A, B, C), phân độ phôi (rất tốt, tốt, trung bình) về động học hình thái phôi:

Cỡ mẫu cho so sánh giữa ba nhóm độc lập được tính bằng phần mềm G*Power 3.1, với kiểm định Kruskal-Wallis (phi tham số tương đương ANOVA một yếu tố), mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, công suất kiểm định (power) = 0,8. Hiệu quả tác động trung bình theo Cohen (effect size f = 0,25). Kết quả: tối thiểu cần thiết là 84 phôi (28 phôi cho mỗi nhóm). Để dự phòng mất mẫu, cỡ mẫu được tăng thêm 20%, dẫn đến tổng số phôi cần thiết là khoảng 102 phôi cho ba nhóm (34 phôi cho mỗi nhóm) [81].

2.5.2. Cỡ mẫu chính của luận án

Để xây dựng mô hình tiên lượng tỷ lệ làm tổ:

Sử dụng package *pmsampsize* [82] của phần mềm R áp dụng cho xây dựng mô hình tiên lượng với kết quả là biến nhị phân để tính cỡ mẫu. Các tham số dùng để tính cỡ mẫu bao gồm: hệ số *shrinkage* (giảm sai lệch do hiện tượng mô hình quá khớp - overfitting) = 0,9 (giá trị mặc định của phần mềm), số biến dự kiến tối đa trong mô hình là 7 (bao gồm EEVA; Hình thái; và 5 thông số động học: tSC: thời gian phôi bắt

đầu nén, tM: thời gian phôi kết thúc quá trình nén, tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang, tBL2: thời gian khoang phôi nang đạt ½ thể tích phôi, tB: thời gian khoang phôi nang đầy), tỷ lệ làm tổ của phôi nang trong nghiên cứu trước của Korkidakis và cộng sự là 59% [83], AUC của các mô hình dự báo tiềm năng làm tổ dựa trên động học hình thái phôi nang là 0,7 [84]. Bằng phần mềm R, chúng tôi tính được cỡ mẫu cần để xây dựng mô hình là 428 chu kỳ chuyển phôi (Hình **2.2**). Trong quá trình nghiên cứu chúng tôi đã thu thập được dữ liệu của 511 chu kỳ chuyển phôi thỏa mãn điều kiện đưa vào phân tích.

```
Given input C-statistic = 0.7  & prevalence = 0.59
Cox-Snell R-sq = 0.132
NB: Assuming 0.05 acceptable difference in apparent & adjusted R-squared
NB: Assuming 0.05 margin of error in estimation of intercept
NB: Events per Predictor Parameter (EPP) assumes prevalence = 0.59

 Samp_size Shrinkage Parameter CS_Rsq Max_Rsq Nag_Rsq  EPP
 Criteria 1     428     0.900         7  0.132   0.742   0.172  36.0
 Criteria 2     188     0.805         7  0.132   0.742   0.172  15.9
 Criteria 3     374     0.900         7  0.132   0.742   0.172  31.7
 Final          428     0.900         7  0.132   0.742   0.172  36.0

Minimum sample size required for new model development based on user inputs = 428,
with 252 events (assuming an outcome prevalence = 0.59) and an EPP = 36.0
```

Hình 2.2. Kết quả tính cỡ mẫu nghiên cứu bằng phần mềm R

2.6. Biến số và chỉ số nghiên cứu

Bảng 2.1. Mô tả các biến số trong nghiên cứu

Biến số	Loại biến	Định nghĩa	Phương pháp thu thập
Làm tổ	Nhị phân	Có hoặc không làm tổ Tỷ lệ làm tổ = $\frac{Tổng\ số\ túi\ thai}{Tổng\ số\ phôi\ chuyển}$ x 100%	Kết quả siêu âm đầu dò đường âm đạo ngày thứ 35 sau chuyển phôi
Thai lâm sàng	Nhị phân	Có hoặc không Tỷ lệ thai lâm sàng = $\frac{Tổng\ số\ chu\ kì\ siêu\ âm\ thấy\ túi\ thai}{Tổng\ số\ chu\ kì\ chuyển\ phôi}$ x100%	Thai lâm sàng được xác định khi kết quả siêu âm bằng đầu dò âm đạo có sự xuất hiện của túi thai sau chuyển phôi 4 tuần

Biến số	Loại biến	Định nghĩa	Phương pháp thu thập
Thai diễn tiến	Nhị phân	Có hoặc không Tỷ lệ thai diễn tiến = $\frac{Tổng\ số\ trường\ hợp\ thai\ diễn\ tiễn}{Tổng\ số\ chu\ kì\ chuyển\ phôi}$x100% Thai diễn tiến là thai ≥12 tuần	Thai trong buồng tử cung được xác nhận bằng siêu âm có hoạt động tim thai tại thời điểm 12 tuần
Trẻ sinh sống	Nhị phân	Có hoặc Không Tỷ lệ trẻ sinh sống = $\frac{Tổng\ số\ trẻ\ \text{sinh}\ ra}{Tổng\ số\ chu\ kì\ chuyển\ phôi}$x100%	Trẻ sinh ra sinh sống
Tuổi mẹ	Liên tục	Tuổi mẹ tính theo năm dương lịch (từ ngày sinh đến ngày chuyển phôi) (năm)	Hỏi người bệnh, khai thác tiền sử, tình trạng có thai của người bệnh
Loại vô sinh	Danh mục	Nguyên phát: chưa từng có thai Thứ phát: đã từng có thai	
BMI	Liên tục	Chỉ số BMI: BMI = $\frac{cân\ nặng\ (kg)}{chiều\ cao^2\ (m)}$	Sử dụng cân bàn và thước đo
AMH	Liên tục	Nồng độ hormone AMH (ng/mL)	Xét nghiệm máu
AFC	Rời rạc	Số nang noãn thứ cấp	Đếm qua siêu âm đầu dò âm đạo vào ngày 2 chu kỳ kích thích buồng trứng
Độ dày NMTC	Liên tục	Xác định trong ngày bổ sung P4. Đơn vị mm. Siêu âm đầu dò âm đạo để xác định niêm mạc tử cung (NMTC) ở mặt cắt dọc giữa của tử cung và đo độ dày ở khoảng cách lớn nhất tính từ ranh giới giữa NMTC và cơ tử cung.	NMTC được xác định bằng cách đo qua siêu âm đầu dò âm đạo, đo vào ngày đặt thuốc progesterone
Tuổi phôi	Thứ hạng	Số ngày nuôi phôi tính từ ngày ICSI: 5, 6	Khai thác từ hồ sơ theo dõi phôi
EEVA		Điểm EEVA từ E1 đến E5	Điểm EEVA của phần mềm
BL		Độ nở của phôi: BL1 đến BL6 (theo phân độ Gardner) [87]	Một mình nghiên cứu sinh (có kinh nghiệm > 5 năm) đánh giá chất lượng phôi, kiểm tra lại bằng hình ảnh trên video time-lapse, chú thích động học
ICM		Chất lượng hình thái của khối ICM: A, B, C (theo phân độ Gardner [87])	
TE		Chất lượng hình thái của lớp tế bào TE: A, B, C (theo phân độ Gardner [87])	
tSC	Liên tục	Thời điểm bắt đầu hiện tượng nén (giờ)	
tM		Thời gian quá trình nén kết thúc (giờ).	

Biến số	Loại biến	Định nghĩa	Phương pháp thu thập
tSB		Thời gian phôi bắt đầu tạo khoang (giờ)	của phôi dựa vào quan sát lại video time-lapse của từng phôi.
tBL2		Thời gian khoang phôi nang chiếm ½ toàn bộ thể tích phôi (giờ)	
tB		Thời gian khoang phôi nang chiếm toàn bộ thể tích phôi (hình ảnh phôi trước khi màng trong suốt bắt đầu mỏng đi) (giờ)	

2.7. Phương pháp thu thập và quản lý số liệu

2.7.1. Nguồn dữ liệu và công cụ thu thập số liệu

Nguồn số liệu của nghiên cứu được thu thập từ cơ sở dữ liệu của Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, bao gồm:

- Hồ sơ bệnh án của người bệnh.
- Phiếu theo dõi phôi tại phòng Lab IVF.
- Video time-lapse của từng chu kỳ nuôi cấy phôi.
- Kết quả xét nghiệm β-hCG.
- Kết quả siêu âm xác định thai (nếu người bệnh thực hiện tại bệnh viện).
- Dữ liệu theo dõi kết quả có thai của Trung tâm Hỗ trợ sinh sản.

Các công cụ sử dụng để thu thập số liệu bao gồm:

- Hồ sơ bệnh án người bệnh.
- Phiếu theo dõi phôi.
- Video time-lapse.
- Phiếu thu thập số liệu nghiên cứu được thiết kế thống nhất.
- Bảng dữ liệu điện tử phục vụ nhập và quản lý số liệu của trung tâm.

2.7.2. Quy trình thu thập số liệu

Việc thu thập số liệu được thực hiện theo các bước sau:

Bước 1: Rà soát cơ sở dữ liệu của trung tâm trong thời gian nghiên cứu.

Bước 2: Sàng lọc các trường hợp theo tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ.

Bước 3: Thu thập các đặc điểm của đối tượng nghiên cứu từ hồ sơ bệnh án.

Bước 4: Thu thập các thông tin về chất lượng phôi từ phiếu theo dõi phôi do chuyên viên phôi đánh giá.

Bước 5: Theo dõi hệ thống video time-lapse, chú thích và trích xuất các thông số động học trong nghiên cứu của từng phôi.

Bước 6. Thu thập kết quả có thai từ cơ sở dữ liệu của trung tâm. Đối chiếu với kết quả xét nghiệm β-hCG và kết quả siêu âm (nếu có) nhằm đảm bảo tính đầy đủ và chính xác của dữ liệu.

2.7.3. Quản lý số liệu

- Các số liệu sau khi thu thập được kiểm tra tính đầy đủ và hợp lệ trước khi mã hóa theo bộ biến nghiên cứu.
- Dữ liệu được nhập vào phần mềm Microsoft Excel và chuyển sang phần mềm thống kê SPSS để xử lý. Quá trình nhập liệu luôn được kiểm tra chéo và rà soát bởi hai người nhằm hạn chế sai sót.
- Sau khi hoàn thành nhập liệu, toàn bộ dữ liệu được làm sạch thông qua việc kiểm tra tính logic, phát hiện các giá trị bất thường, dữ liệu thiếu hoặc không phù hợp và đối chiếu với hồ sơ gốc khi cần thiết.
- Cơ sở dữ liệu nghiên cứu được lưu trữ trên máy tính có mật khẩu và chỉ nhóm nghiên cứu được quyền truy cập nhằm đảm bảo tính bảo mật của thông tin.

2.8. Phương pháp kiểm soát sai số và đảm bảo chất lượng số liệu

Để đảm bảo tính chính xác, khách quan và độ tin cậy của kết quả nghiên cứu, các biện pháp kiểm soát sai số và đảm bảo chất lượng số liệu được thực hiện như sau:

- **Kiểm soát sai số chọn mẫu:** Đối tượng nghiên cứu được lựa chọn theo đúng tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ đã xác định trước. Toàn bộ các trường hợp đủ điều kiện trong khoảng thời gian nghiên cứu được đưa vào phân tích.
- **Kiểm soát sai số thông tin:** Dữ liệu được thu thập từ các nguồn thông tin chuẩn hóa của trung tâm, bao gồm hồ sơ bệnh án, phiếu theo dõi phôi, hệ thống time-lapse, kết quả xét nghiệm β-hCG và kết quả siêu âm. Các biến số và chỉ số nghiên cứu được định nghĩa, mã hóa và phân loại thống nhất trước khi thu thập dữ liệu. Đồng thời, thông tin được đối chiếu giữa các nguồn dữ liệu khi cần thiết nhằm đảm bảo tính đầy đủ và nhất quán.
- **Kiểm soát sai số do mất thông tin theo dõi:** Đối với các trường hợp chưa đầy đủ thông tin về kết cục nghiên cứu, dữ liệu được rà soát từ hệ thống quản lý của trung tâm. Trường hợp cần thiết, người bệnh được liên hệ theo quy trình theo dõi của bệnh viện để bổ sung hoặc xác minh thông tin. Trong trường hợp không đủ dữ liệu, người bệnh sẽ bị loại khỏi nghiên cứu.
- **Kiểm soát sai số nhập liệu:** Dữ liệu được nhập theo bộ mã hóa thống nhất và được kiểm tra tính logic sau khi nhập. Các giá trị thiếu, ngoại lai hoặc không nhất quán được rà soát và đối chiếu với hồ sơ gốc. 10% dữ liệu được kiểm tra ngẫu nhiên nhằm đánh giá tính chính xác của quá trình nhập liệu.
- **Kiểm tra tính đầy đủ của dữ liệu:** Toàn bộ các chu kỳ chuyển phôi được đưa vào phân tích đều có đầy đủ thông tin đối với các biến số và chỉ số nghiên cứu theo kế hoạch phân tích. Do đó, nghiên cứu không ghi nhận dữ liệu thiếu ở các

biến được sử dụng trong phân tích; không cần thực hiện bù dữ liệu thiếu hoặc phân tích độ nhạy liên quan đến dữ liệu thiếu.

- **Kiểm soát yếu tố nhiễu:** Ngay từ giai đoạn thiết kế nghiên cứu, các tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ được xây dựng nhằm hạn chế các yếu tố gây nhiễu. Để hạn chế sai số trong đánh giá, việc đánh giá điểm EEVA, hình thái phôi nang và xác định các thông số động học được thực hiện bởi một nghiên cứu sinh. Trong giai đoạn phân tích số liệu, các yếu tố nhiễu tiềm tàng được xem xét và điều chỉnh bằng các phương pháp thống kê phù hợp.
- **Đảm bảo chất lượng số liệu:** Dữ liệu chỉ được đưa vào phân tích sau khi hoàn thành quá trình kiểm tra, làm sạch và xác nhận tính đầy đủ, tính hợp lệ và tính nhất quán. Cơ sở dữ liệu nghiên cứu được lưu trữ an toàn, bảo mật và chỉ nhóm nghiên cứu được quyền truy cập.

2.9. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

2.9.1. Phần mềm và nguyên tắc phân tích số liệu

Dữ liệu sau khi thu thập được mã hóa và quản lý bằng Microsoft Excel. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS Statistics phiên bản 26 và phần mềm ngôn ngữ thống kê R phiên bản 4.5.2.

Các kiểm định thống kê được thực hiện với mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$. Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

2.9.2. Kế hoạch phân tích số liệu

Bước 1: Mô tả đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

- Các biến số định tính (bao gồm biến nhị phân, danh mục và thứ hạng) được trình bày dưới dạng tần suất và tỷ lệ %.
- Các biến liên tục được mô tả bằng trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± Standard Deviation - SD) nếu phân bố chuẩn, hoặc trung vị - Median (khoảng tứ phân vị - Interquartile range IQR, Q1-Q3) nếu phân bố không chuẩn.

Bước 2: Kiểm định thống kê

Đối với biến định lượng, phân bố được kiểm tra bằng kiểm định Kolmogorov-Smirnov hoặc Shapiro-Wilk.

- Nếu phân bố chuẩn, so sánh giá trị trung bình ở 2 nhóm bằng kiểm định t cho hai mẫu độc lập; khi so sánh trên 2 nhóm, sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA).
- Nếu phân bố không chuẩn, so sánh giữa 2 nhóm bằng kiểm định Mann-

Whitney U (phi tham số tương đương kiểm định t cho 2 mẫu độc lập); khi so sánh giữa nhiều hơn 2 nhóm sử dụng kiểm định Kruskal-Wallis (phi tham số tương đương ANOVA một yếu tố), trong trường hợp khác biệt có ý nghĩa thống kê, tiến hành phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni.

Đối với biến định tính, so sánh tỷ lệ bằng kiểm định Chi-square hoặc Fisher's exact khi tần số mong đợi < 5.

Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Phân tích cụ thể:

- So sánh tỷ lệ hình thành phôi nang, phân bố về phân độ hình thái phôi nang, chất lượng ICM, TE và độ nở giữa các mức điểm EEVA được thực hiện bằng kiểm định Chi-square hoặc Fisher's exact.
- Đánh giá giá trị tiên lượng của EEVA với tỷ lệ hình thành phôi nang, chất lượng phôi nang theo hình thái được thực hiện bằng mô hình phương trình ước lượng tổng quát (Generalized Estimating Equations - GEE), nhằm xử lý sự tương quan nội tại do một bệnh nhân có thể đóng góp nhiều phôi [9].
- Mối liên quan giữa biến định lượng (các thông số động học hình thái) và phân độ hình thái, chất lượng ICM, TE, và độ nở được đánh giá bằng cách so sánh giá trị trung vị giữa các nhóm bằng kiểm định Kruskal - Wallis; khi có khác biệt có ý nghĩa thống kê, tiến hành phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định Mann - Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni.
- Mối liên quan giữa các biến định tính (phân độ hình thái, chất lượng ICM, TE, độ nở và điểm EEVA) và các nhóm kết quả thai được đánh giá bằng kiểm định Chi-square hoặc Fisher's exact.
- Mối liên quan giữa các biến định lượng (thông số động học hình thái) và kết quả thai được đánh giá bằng cách so sánh giá trị trung vị giữa các nhóm bằng kiểm định Mann - Whitney U.

Bước 3: Khảo sát các biến trước khi xây dựng mô hình [88]

- Phân tích GEE đơn biến được thực hiện để xác định các biến có liên quan đến kết quả làm tổ. Mô hình này được sử dụng để xử lý sự tương quan giữa các phôi của cùng một bệnh nhân, do mỗi bệnh nhân có thể đóng góp nhiều chu kỳ chuyển phôi trong nghiên cứu.
- Đa cộng tuyến giữa các biến động học hình thái được kiểm tra bằng hồi quy tuyến tính thông qua hệ số dung sai (Tolerance) và hệ số phóng đại phương sai (Variance Inflation Factor-VIF). Tolerance < 0,2 hoặc VIF > 5 được xem

là có đa cộng tuyến đáng kể.

- Các biến có ý nghĩa thống kê hoặc có ý nghĩa lâm sàng được đưa vào mô hình GEE đa biến [88,89].
- ***Bước 4:*** Xây dựng mô hình tiên lượng tỷ lệ làm tổ của chuyển đơn phôi nang đông lạnh sử dụng hồi quy logistic với phương trình ước lượng tổng quát (GEE) đa biến [9,89]. Do một bệnh nhân có thể trải qua nhiều chu kỳ chuyển phôi, các quan sát trong cùng bệnh nhân có khả năng tương quan, sự tương quan giữa các chu kỳ của cùng một bệnh nhân là tương tự nhau. Phân tích hồi quy GEE với phân bố nhị thức, hàm liên kết logit và cấu trúc tương quan làm việc tương quan hoán đổi (Exchangeable) được sử dụng để đánh giá mối liên quan giữa các yếu tố nghiên cứu và kết quả làm tổ. Bệnh nhân được xác định là đơn vị phân cụm, còn chu kỳ chuyển phôi là đơn vị phân tích. GEE cho phép tính đến sự tương quan này khi ước lượng các hệ số hồi quy, đồng thời cung cấp các ước lượng về mối liên quan giữa các yếu tố tiên lượng và kết quả chuyển phôi ở mức trung bình quần thể. Các hệ số hồi quy ước lượng từ mô hình GEE đa biến được sử dụng để xây dựng phương trình tiên lượng. Với hàm liên kết logit, xác suất dự báo được tính từ tổ hợp tuyến tính của hệ số chặn và các hệ số hồi quy tương ứng với giá trị các biến tiên lượng
- Sàng lọc biến bằng phân tích đơn biến kết hợp với cơ sở lâm sàng, sau đó xây dựng và so sánh các mô hình đa biến theo nhóm yếu tố tiên lượng. Đầu tiên các biến được đánh giá bằng phân tích hồi quy đơn biến nhằm khảo sát mối liên quan của các biến với kết cục làm tổ. Sau khi thực hiện phân tích đơn biến, các biến có ý nghĩa thống kê có giá trị $p < 0,05$ hoặc với những biến có giá trị $p > 0,05$ nhưng có ý nghĩa lâm sàng (như tuổi mẹ, tuổi phôi) được lựa chọn để đưa vào mô hình đa biến nhằm đánh giá độc lập khả năng tiên lượng kết quả làm tổ của các biến. Dựa trên mục tiêu nghiên cứu, các nhóm yếu tố tiên lượng và đặc điểm dữ liệu, chúng tôi xây dựng 5 mô hình lựa chọn phôi: (1) Mô hình 1 - mô hình hình thái, (2) Mô hình 2 - mô hình EEVA, (3) Mô hình 3 - mô hình động học hình thái, (4) Mô hình 4 - mô hình kết hợp EEVA và hình thái, (5) Mô hình 5 - mô hình kết hợp EEVA, hình thái và động học hình thái sử dụng hồi quy đa biến GEE [9]. Thành phần biến của từng mô hình được giữ nguyên trong quá trình đánh giá và so sánh hiệu năng tiên lượng, không loại bỏ biến chỉ dựa trên ý nghĩa thống kê riêng lẻ của hệ số hồi quy. Hiệu năng các mô hình được so sánh nhằm đánh giá khả năng tiên lượng của từng nhóm yếu tố và giá trị bổ sung của việc kết hợp các đặc điểm hình thái, điểm EEVA và thông số động học trong tiên lượng kết quả chuyển phôi nang.

- Đánh giá độ phù hợp của mô hình: Độ phù hợp của mô hình tiên lượng được đánh giá thông qua biểu đồ hiệu chỉnh (calibration plot) và các chỉ số calibration, nhằm đánh giá mức độ tương đồng giữa xác suất kết quả dự đoán bởi mô hình và tỷ lệ kết quả quan sát thực tế [90].
- Khả năng phân biệt của mô hình được đánh giá bằng diện tích dưới đường cong ROC (Area Under the Curve - AUC**)**. So sánh hiệu năng phân biệt giữa các cặp mô hình được thực hiện thông qua chênh lệch AUC (ΔAUC). Do một bệnh nhân có thể đóng góp nhiều chu kỳ chuyển phôi, phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) được sử dụng để tính toán khoảng tin cậy 95% của chênh lệch AUC, bảo đảm duy trì cấu trúc phụ thuộc giữa các chu kỳ của cùng một bệnh nhân. Việc so sánh được thực hiện trên cùng tập dữ liệu và cùng đơn vị lấy mẫu lại cho các mô hình trong mỗi lần bootstrap. Mức ý nghĩa thống kê được xác định là $p < 0,05$ [91,92].

Bước 5: Nội kiểm mô hình được chọn [93,94]

Nội kiểm được thực hiện bằng phương pháp bootstrap 1000 lần nhằm ước tính độ lạc quan (optimism) và hiệu chỉnh các chỉ số hiệu năng [93,94]. Kiểm định nội bộ mô hình được thực hiện bằng phương pháp bootstrap với 1.000 lần lấy mẫu lại ở cấp độ bệnh nhân. Trong mỗi lần lấy mẫu, bệnh nhân được chọn làm đơn vị lấy mẫu; toàn bộ các chu kỳ chuyển phôi thuộc bệnh nhân được chọn được giữ lại nhằm bảo toàn cấu trúc phụ thuộc giữa các quan sát trong cùng bệnh nhân.

Hiệu năng mô hình được đánh giá theo ba khía cạnh:

- *Khả năng phân biệt:* Khả năng phân biệt được xác định bằng AUC, phản ánh khả năng của mô hình trong việc phân biệt giữa các trường hợp có và không xảy ra biến cố. Giá trị AUC dao động từ 0,5 (không có khả năng phân biệt) đến 1,0 (phân biệt hoàn hảo).
- *Độ hiệu chỉnh:* Độ hiệu chỉnh của mô hình được đánh giá bằng biểu đồ hiệu chuẩn (calibration plot), nhằm so sánh xác suất làm tổ do mô hình dự đoán với thực tế. Đường 45° biểu thị sự phù hợp hoàn hảo giữa dự đoán và thực tế. Calibration slope được sử dụng để đánh giá mức độ phóng đại hệ số hồi quy (hiện tượng quá khớp-overfitting), với giá trị lý tưởng bằng 1; calibration intercept phản ánh sai lệch hệ thống của mô hình, với giá trị lý tưởng bằng 0.
- *Độ chính xác tổng thể (Brier score):* Độ chính xác tổng thể được đánh giá bằng chỉ số Brier, là trung bình của bình phương sai số giữa xác suất dự đoán và kết quả thực tế, chỉ số càng nhỏ cho thấy mô hình dự đoán càng chính xác.

Bước 6: Xây dựng nomogram

Nomogram được xây dựng dựa trên mô hình hồi quy logistic đa biến với phương trình ước lượng tổng quát (GEE) cuối cùng nhằm trực quan hóa mối liên quan giữa các yếu tố tiên lượng và xác suất làm tổ. Mỗi biến được quy đổi thành một thang điểm tỷ lệ với hệ số hồi quy của nó. Tổng điểm tương ứng với xác suất dự đoán cá thể hóa cho từng chu kỳ chuyển phôi. Công cụ này giúp chuyển đổi mô hình thống kê thành phương tiện hỗ trợ quyết định lâm sàng, là công cụ thể hiện trực quan phương trình tiên lượng của mô hình GEE. Khả năng phân biệt và hiệu chỉnh của mô hình được đánh giá riêng để xác định mức độ phù hợp của xác suất dự báo.

Sử dụng phần mềm ngôn ngữ thống kê R 4.5.2 để xây dựng nomogram.

2.10. Quy trình tại phòng Lab IVF

2.10.1. Xử lý noãn, tinh trùng

Noãn sau khi chọc hút được thu nhặt, rửa và ủ trong môi trường nuôi cấy G-IVF PLUS đã được cân bằng trước (Vitrolife, Sweden), tại tủ Benchtop BT37 ở 37^0C và sử dụng khí trộn 6% CO2, 5% O2. Sau thời gian ủ (khoảng 3 giờ), noãn được tách khỏi phức hợp noãn - tế bào hạt (cumulus-oocyte complex - COC) bằng phương pháp cơ học trong môi trường G-IVF PLUS chứa enzyme hyaluronidase 80 IU/mL.

Tinh trùng sử dụng cho quá trình ICSI được lọc rửa bằng phương pháp thang nồng độ (density gradient). Toàn bộ noãn sau ICSI được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy liên tục Continuous single culture-NXC (Irvine Scientific).

2.10.2. Nuôi cấy phôi tủ GERI Plus có tích hợp phần mềm đánh giá phôi EEVA

Tủ nuôi cấy time-lapse GERI Plus được tích hợp hệ thống đánh giá phôi tự động EEVA phiên bản 3.1, sử dụng hệ thống khí trộn và chế độ nuôi cấy ẩm. Hệ thống ghi nhận hình ảnh của từng phôi sau mỗi 5 phút tại 11 mặt phẳng tiêu cự khác nhau với độ phân giải cao, cho phép theo dõi liên tục quá trình phát triển của phôi mà không cần đưa phôi ra khỏi tủ nuôi cấy. Vào thời điểm 68 giờ sau tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI), chuyên viên phôi học xác định và nhập số lượng phôi bào của từng phôi vào phần mềm. Đồng thời xem lại video time-lapse để xác nhận các chú thích thông tin về động học của phần mềm. Dựa trên các thông số động học phát triển kết hợp với số lượng phôi bào tại thời điểm này, phần mềm EEVA tự động phân loại tiềm năng phát triển của từng phôi thành năm mức từ E1 đến E5, trong đó E1 biểu thị khả năng phát triển thành phôi nang cao nhất và E5 là thấp nhất.

Sau ICSI, noãn được đặt vào đĩa nuôi cấy GERI, với tối đa 16 noãn được nuôi trong 16 giếng riêng biệt, sử dụng chung một giọt khoảng 80 µL môi trường nuôi cấy liên tục CSCM-NXC (Irvine Scientific, Hoa Kỳ) và được phủ 3 mL dầu khoáng

OVOIL (Vitrolife, Thụy Điển). Các noãn được nuôi cấy trong tủ GERI ở nhiệt độ 37°C, với hỗn hợp khí gồm 6% CO_2, 5% O_2 và điều kiện nuôi cấy ẩm. Trong suốt quá trình nuôi cấy, phôi được theo dõi liên tục bằng hệ thống time-lapse, giúp hạn chế tối đa việc đưa phôi ra khỏi môi trường nuôi cấy để quan sát. Bên cạnh kết quả phân loại của phần mềm EEVA, hình thái phôi được đánh giá độc lập theo quy trình thường quy của phòng Lab IVF. Đối với các trường hợp có chỉ định nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang, phôi được hỗ trợ thoát màng và thay môi trường nuôi cấy vào ngày 3 trước khi tiếp tục nuôi cấy đến ngày 5 hoặc ngày 6.

Trong suốt quá trình nuôi cấy, mọi thao tác liên quan đến phôi, bao gồm lấy đĩa nuôi cấy ra khỏi tủ, thực hiện hỗ trợ thoát màng, thay môi trường nuôi cấy và đưa đĩa trở lại tủ GERI đều được thực hiện theo nguyên tắc kiểm tra kép (double check). Hai chuyên viên phôi cùng tham gia đối chiếu thông tin định danh của bệnh nhân, vị trí phôi và các thao tác kỹ thuật trước, trong và sau mỗi quy trình nhằm đảm bảo tính chính xác, an toàn và hạn chế tối đa nguy cơ nhầm lẫn trong quá trình nuôi cấy phôi.

2.10.3. Đánh giá và phân độ phôi theo hình thái

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời điểm đánh giá thụ tinh và chất lượng phôi (Bảng **2.2**), hình thái phôi ngày 3 (Bảng **2.3**) được thực hiện theo đồng thuận đánh giá chất lượng phôi theo phân loại của Alpha 2011 [2]. Chất lượng phôi ngày 5 được đánh giá dựa trên hình thái phôi theo phân loại của Gardner và cộng sự (Bảng **2.4**) [34]. Riêng về độ nở, chúng tôi chia phôi đang thoát màng thành BL5 (TE thoát màng ≤ ½ thể tích phôi), BL6 (thoát màng ≥ ½ thể tích phôi), BL7 (phôi đã thoát màng). Về cơ bản không làm thay đổi tính chất của hệ thống phân loại theo Gardner và cộng sự.

Việc áp dụng các tiêu chuẩn đánh giá quốc tế đảm bảo tính thống nhất giữa các chuyên viên phôi học và tăng khả năng so sánh kết quả với các nghiên cứu đã được công bố. Tất cả các phôi trong nghiên cứu đều được đánh giá theo cùng một quy trình và cùng hệ thống tiêu chuẩn nhằm hạn chế sai số trong quá trình thu thập số liệu và phân tích kết quả.

Bảng 2.2. Thời điểm đánh giá thụ tinh và phân loại phôi từng giai đoạn

Giai đoạn	Thời điểm (giờ)
Hợp tử	17 ± 1
Phôi ngày 3	68 ± 2
Phôi ngày 5	116 ± 2

** Nguồn: Cập nhật đồng thuận Alpha đánh giá phân loại noãn và phôi (2025)* [2]

Bảng 2.3. Phân loại hình thái phôi ngày 3 theo tiêu chuẩn đồng thuận Alpha

Phân loại	Mô tả
Tốt	• Phôi 7-8 phôi bào, các phôi bào tương đối đồng đều • Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương < 10%
Trung bình	• Phôi có < 7 phôi bào, đa số phôi bào tương đối đồng đều • Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương 10 - 25%
Xấu	• Các phôi bào có kích thước không đồng đều • Tỷ lệ mảnh vỡ bào tương >25 %

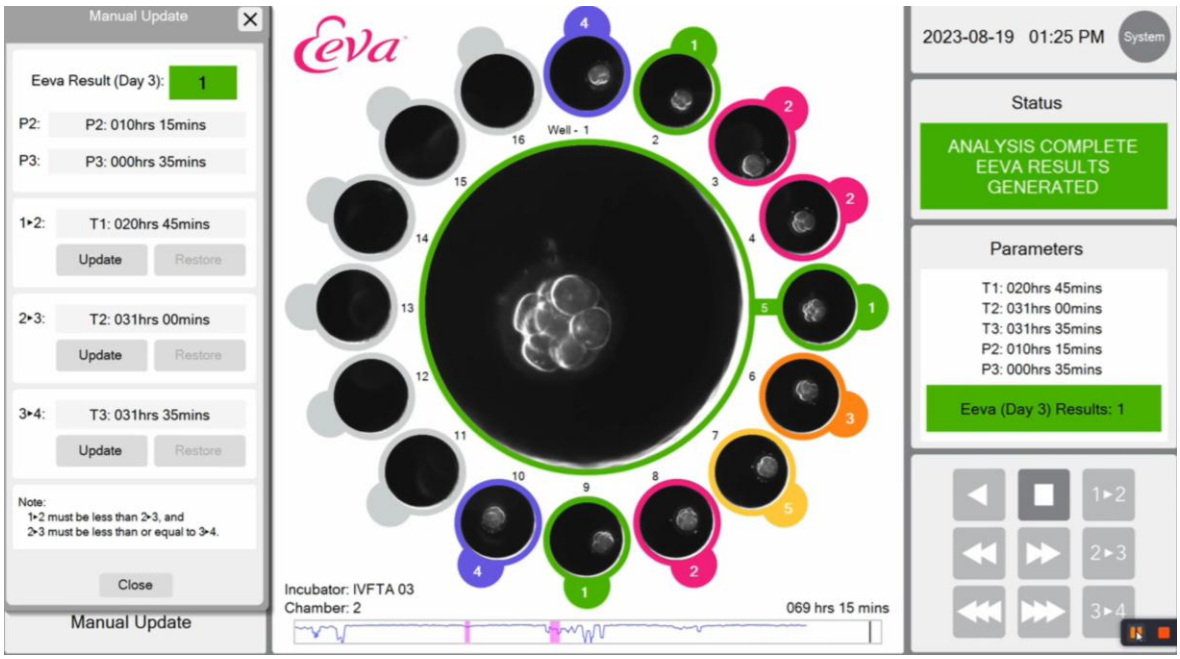
** Nguồn Cập nhật đồng thuận Alpha đánh giá phân loại noãn và phôi (2025)* [2]

Bảng 2.4. Phân loại chất lượng phôi nang theo hình thái

Phân loại	Mô tả
Rất tốt (RT)	• Phôi độ nở ≥ BL3 • Phân loại ICM và TE: AA
Tốt (T)	• Phôi có mức độ giãn rộng ≥ BL3 • Phân loại ICM và TE là: AB; BA, BB
Trung bình (TB)	• Phôi có mức độ giãn rộng ≥ BL3 • Phân loại ICM và TE là: AC; CA; BC, CB; CC
Xấu (X)	• Hoặc độ giãn rộng ≥ BL3, không có tế bào ICM, không có tế bào TE; tế bào ICM hoặc TE bị thoái hóa

** Phân loại độ nở phôi nang, chất lượng ICM, TE theo phân loại Gardner và Schoolcraft* [34]. *Phân độ phôi theo* [85]

2.10.4. Đánh giá phôi theo hệ thống EEVA phiên bản 3.1 tại trung tâm



Hình 2.3. Giao diện màn hình chấm điểm của hệ thống EEVA phiên bản 3.1

*Hệ thống EEVA thể hiện 16 giếng (**well**) cho 16 phôi riêng biệt. Tủ nuôi cấy (**incubator**) và số thứ tự buồng nuôi cấy (**chamber**) được hiển thị tương ứng. Hệ thống tự nhận biết các tham số (**parameters**): thời gian phân chia tế bào (T1, T2, T3: thời gian phôi phân chia thành 2, 3 và 4 tế bào, tính theo giờ (hrs) và phút (mins)), P2 và P3, tương ứng với thời gian giai đoạn 2 tế bào và 3 tế bào. Khi quá trình phân tích hoàn tất, hệ thống tự động đưa ra điểm EEVA **(Analysis complete EEVA results generated)**. Mỗi phôi sẽ có một điểm EEVA ngày 3 **(EEVA Day 3 results)**. Trong trường hợp hệ thống nhận diện thời gian phân chia chưa chính xác, chuyên viên phôi có thể cập nhật lại thông tin bằng chức năng (**Manual update)**.*

Hệ thống EEVA phiên bản 3.1 có khả năng theo dõi đồng thời tối đa 16 phôi. Trên giao diện phần mềm, mỗi giếng (well) được hiển thị tương ứng với một phôi, kèm theo thông tin về tủ nuôi cấy (incubator) và vị trí buồng nuôi cấy (chamber), giúp chuyên viên phôi quản lý và theo dõi từng phôi trong suốt quá trình nuôi cấy.

Trước khi bắt đầu nuôi cấy, chuyên viên phôi nhập vào hệ thống các thông tin ban đầu, bao gồm thông tin bệnh nhân, thời điểm ICSI và tuổi noãn tại thời điểm chọc hút noãn. Đây là những dữ liệu cần thiết để phần mềm chuẩn hóa thời gian phát triển của phôi và là một trong những thông số được sử dụng trong thuật toán tính điểm EEVA. Từ video time-lapse ghi nhận được, phần mềm EEVA tự động nhận diện các mốc động học phân chia của phôi, bao gồm thời điểm phôi đạt 2 tế bào (t2), 3 tế bào (t3) và 4 tế bào (t4), sau đó tính toán các thông số động học quan trọng như thời gian kéo dài của giai đoạn 2 tế bào (P2 = t3 - t2) và giai đoạn 3 tế bào (P3 = t4 - t3). Đồng thời, hệ thống cũng ghi nhận các đặc điểm phát triển của phôi trong 68 giờ đầu sau thụ tinh để phục vụ cho quá trình phân tích.

Sau khi phần mềm tự động nhận diện các mốc phát triển, kết quả của phần mềm không được sử dụng ngay mà cần được chuyên viên phôi học kiểm tra và xác nhận. Đối với từng phôi, chuyên viên phôi phải xem lại toàn bộ video time-lapse nhằm đối chiếu các mốc phân chia đã được phần mềm chú thích với diễn biến phát triển thực tế của phôi. Trong quá trình phân tích hình ảnh, hệ thống có thể gặp khó khăn khi các tế bào chồng lấp lên nhau, hình ảnh không rõ nét hoặc xuất hiện các mảnh vỡ tế bào (fragmentation). Những trường hợp này có thể dẫn đến việc phần mềm nhận diện nhầm mảnh vỡ là phôi bào hoặc xác định chưa chính xác thời điểm phân chia của phôi. Vì vậy, chuyên viên phôi học phải đánh giá lại từng mốc phân chia, xác định chính xác thời điểm xuất hiện của 2, 3 và 4 tế bào, đồng thời hiệu chỉnh các chú thích bằng chức năng "*Manual Update"* khi cần thiết. Sau mỗi lần hiệu chỉnh, các thông số động học của phôi sẽ được hệ thống cập nhật tương ứng.

Bên cạnh việc kiểm tra các mốc phân chia, tại thời điểm 68 giờ sau ICSI, chuyên viên phôi học tiếp tục xem lại video time-lapse để xác định chính xác số lượng phôi bào của từng phôi ngày 3 và nhập thông tin này vào hệ thống. Trong quá trình phân chia phôi có thể tạo ra các mảnh vỡ, là những tế bào giống phôi bào có kích thước nhỏ và không có nhân. Thông qua video về time-lapse các chuyên viên phôi sẽ nhận biết về cách thức phân chia, đặc điểm phôi bào để tránh nhận diện nhầm các mảnh vỡ thành phôi bào. Đây là một bước quan trọng vì số lượng phôi bào tại thời điểm 68 giờ là một trong những biến số đầu vào của thuật toán EEVA. Như vậy, đối với mỗi phôi được phân tích, chuyên viên phôi học cần phải thực hiện tuần tự các bước gồm kiểm tra video time-lapse, đối chiếu các mốc phân chia, hiệu chỉnh các trường hợp nhận diện chưa chính xác, đánh giá, xác nhận số lượng phôi bào ngày 3 và hoàn thiện dữ liệu trước khi phần mềm tiến hành tính toán kết quả cuối cùng. Chỉ sau khi toàn bộ các thông tin đã được kiểm tra, hiệu chỉnh và xác nhận, hệ thống mới thực hiện tính toán và đưa ra điểm EEVA cho từng phôi.

Hệ thống EEVA sử dụng thuật toán độc quyền của nhà sản xuất để tính toán điểm đánh giá dựa trên tuổi noãn, các thông số động học (P2 và P3), số lượng phôi bào tại thời điểm 68 giờ sau ICSI và các đặc điểm phát triển của phôi trong 68 giờ đầu sau thụ tinh. Kết quả cuối cùng được biểu thị dưới dạng điểm EEVA ngày 3 (*EEVA Day 3 Results*), trong đó mỗi phôi được xếp vào một trong năm mức từ E1 đến E5. Mức E1 tương ứng với khả năng phát triển thành phôi nang cao nhất, trong khi mức E5 biểu thị khả năng phát triển thấp nhất. Các kết quả này được sử dụng để hỗ trợ chuyên viên phôi lựa chọn phôi để chuyển hoặc tiếp tục nuôi cấy, kết hợp với các tiêu chí đánh giá hình thái và các thông tin lâm sàng khác (Hình **2.3**).

2.10.5. Bảo quản lạnh sâu và phục hồi sau bảo quản

Phôi chưa phát triển đủ điều kiện đông lạnh (độ nở BL≤ 2) được theo dõi lên ngày 6, đánh giá hình thái vào 140 ± 2 giờ sau ICSI. Hình thái phôi nang được đánh giá và phân loại theo phân độ Gardner và Schoolcraft [34], phôi nang đạt chất lượng trung bình (≥ BL3CC) [85] sẽ được đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa, môi trường Cryotech (Vitrification Cryotech, Nhật Bản). Phôi sẽ được đông riêng lẻ, mỗi phôi nang sẽ được đông trên một cọng trữ phôi. Bệnh nhân có chỉ định chuyển phôi sẽ rã đông phôi vào ngày chuyển phôi bằng môi trường rã đông Cryotech (Warming Cryotech, Nhật Bản), phôi được rã đông trước khi chuyển ít nhất 2 giờ và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy liên tục Continuous single culture-NXC (Irvine Scientific).

2.10.6. Nuôi cấy phôi sau khi rã đông, quy trình chuyển phôi nang đông lạnh và hỗ trợ hoàng thể

Phôi được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy đơn giọt sử dụng môi trường nuôi cấy liên tục NXC (Irvine Scientific) sau rã đông ít nhất 2 giờ trước khi chuyển phôi. Chất lượng phôi nang được đánh giá lại trước khi chuyển theo phương pháp đánh giá hình thái truyền thống. Chỉ những phôi nang duy trì chất lượng tương đương hoặc phát triển tốt hơn so với chất lượng phôi nang trước khi đông phôi thủy tinh hóa mới được sử dụng trong nghiên cứu này.

Liệu pháp thay thế hormone (hormonal replacement therapy - HRT) được bắt đầu vào ngày thứ hai của chu kỳ kinh nguyệt cho tất cả bệnh nhân. Để đảm bảo độ dày niêm mạc tử cung tối ưu, bệnh nhân được yêu cầu siêu âm kiểm tra nội mạc tử cung, tử cung và phần phụ vào ngày 10 và ngày 14 của chu kỳ kinh nguyệt. Khi độ dày niêm mạc tử cung đạt tối thiểu 7mm, quá trình chuyển đổi niêm mạc tử cung được thực hiện bằng cách sử dụng progesterone vi hạt đặt âm đạo với liều hàng ngày 600–800 mg (Utrogestan, Besins, Thái Lan hoặc Cyclogest, Actavis U.K. Limited, Vương quốc Anh), ngoài ra còn được uống Dydrogesterone với liều hàng ngày 30 mg (Duphaston, Abbott Biologicals B.V., Hà Lan). Phôi nang được chuyển sau khoảng (120 ± 3) giờ. Quy trình chuyển phôi tuân thủ theo hướng dẫn năm 2017 của Hiệp hội Y học Sinh sản Hoa Kỳ (ASRM). Trong trường hợp ống thông gặp khó khăn khi đi qua kênh cổ tử cung vào buồng tử cung, dẫn đến thời gian chuyển phôi kéo dài và cần sử dụng ống thông có đầu nối mềm hoặc kẹp cổ tử cung ponzi, quy trình này được ghi nhận là chuyển phôi khó [86].

2.11. Khía cạnh đạo đức của nghiên cứu

- Nghiên cứu này đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh, Hà Nội, Việt Nam phê duyệt (số chấp thuận: IRB.TAHN.055).
- Nghiên cứu được tiến hành với sự đồng ý của ban lãnh đạo bệnh viện.
- Mục tiêu nghiên cứu và các kỹ thuật áp dụng không làm ảnh hưởng tới sức khỏe, quyền lợi và quá trình điều trị của người bệnh. Việc nghiên cứu nhằm góp phần lựa chọn phôi chuyển có tiềm năng làm tổ tốt nhất.
- Nghiên cứu được thực hiện theo đúng quy trình chuyên môn, bảo đảm hạn chế tối đa các sai sót trong quá trình thực hiện kỹ thuật và thu thập số liệu.
- Nghiên cứu được tiến hành với tinh thần trung thực, khách quan và minh bạch trong thu thập, xử lý, phân tích và báo cáo số liệu.
- Kết quả nghiên cứu chỉ được sử dụng phục vụ mục đích nghiên cứu khoa học và nâng cao chất lượng điều trị, không sử dụng vì mục đích cá nhân. Mọi thông tin của người bệnh được bảo mật theo quy định.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu chúng tôi đã phân tích 2522 phôi từ 291 chu kỳ ICSI được nuôi cấy phôi nang (ngày 5 hoặc ngày 6) trong tủ nuôi cấy time-lapse GERI để đánh giá kết quả phôi nang. Phân tích 511 phôi nang được chuyển trong 511 chu kỳ chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông từ tháng 3 năm 2020 đến hết tháng 12 năm 2023 phù hợp với tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ để đánh giá kết quả thai kỳ, xây dựng mô hình. Trong các chu kỳ chuyển phôi, 320 bệnh nhân có 1 chu kỳ chuyển phôi, 80 bệnh nhân có 2 chu kỳ, 9 bệnh nhân có 3 chu kỳ, 1 bệnh nhân có 4 chu kỳ. Tổng số có 410 bệnh nhân khác nhau tạo ra 511 chu kỳ chuyển phôi. Chúng tôi thu được kết quả như sau:

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm chu kỳ kích thích buồng trứng và tạo phôi

Đặc điểm chung về mô tả và nhân khẩu học của bệnh nhân thực hiện phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) trong nghiên cứu được thể hiện ở Bảng **3.1**.

Bảng 3.1. Đặc điểm chung về mô tả và nhân khẩu học của bệnh nhân thực hiện phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI)

Đặc điểm	Giá trị
Số chu kỳ, số lượng	291
Tuổi phụ nữ trung bình *, năm, mean±SD	30,49±4,90
Khoảng tuổi, năm, nhỏ - lớn nhất	20-49
BMI phụ nữ* (kg/m^2) (mean ± SD)	21,11±2,4
Số noãn chọc hút, Median (IQR, Q1-Q3)	17 (13-23)
Số noãn ICSI, Median (IQR, Q1-Q3)	13 (9-17)
Tỷ lệ thụ tinh$^{\#}$, %	83,8
Số phôi nuôi cấy phôi nang, số lượng	2522
Tỷ lệ phôi nang$^{\#}$, % (số lượng)	61 (1537/2522)

**Dữ liệu liên tục được thể hiện dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (mean ± Standard Deviation - SD); hoặc trung vị (khoảng tứ phân vị), Median (Interquartile range - IQR, Q1 - Q3); #Dữ liệu phân loại được thể hiện dưới dạng phần trăm (%). ICSI: Intracytoplasmic sperm injection*

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tổng cộng 291 chu kỳ ICSI được đưa vào phân tích. Tuổi trung bình của phụ nữ trong nghiên cứu là 30,49 ± 4,90 tuổi, dao động từ 20 đến 49 tuổi. Đây là nhóm tuổi sinh sản tương đối trẻ, phù hợp với đặc điểm

bệnh nhân IVF tại các quốc gia châu Á, đa số bệnh nhân tìm đến điều trị hỗ trợ sinh sản khi tuổi còn dưới 35. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng tuổi người phụ nữ là yếu tố tiên lượng quan trọng đối với số lượng và chất lượng noãn, tỷ lệ phôi nang cũng như tỷ lệ làm tổ và trẻ sinh sống sau chuyển phôi [95]. Việc quần thể nghiên cứu có tuổi trung bình thấp giúp giảm thiểu ảnh hưởng nhiễu của yếu tố tuổi cao lên chất lượng phôi và động học phát triển phôi nang, từ đó làm rõ hơn vai trò của các thông số phôi học được phân tích trong nghiên cứu này [95].

Chỉ số BMI trung bình của phụ nữ là 21,11 ± 2,4 kg/m², nằm trong ngưỡng bình thường theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới cho quần thể châu Á [96]. Điều này cho thấy đa số bệnh nhân trong nghiên cứu không thuộc nhóm thừa cân hoặc béo phì, những tình trạng đã được chứng minh có thể ảnh hưởng tiêu cực đến đáp ứng kích thích buồng trứng, chất lượng noãn, tỷ lệ thụ tinh và kết quả thai kỳ. Do đó, quần thể nghiên cứu tương đối đồng nhất về mặt chuyển hóa, góp phần hạn chế sai lệch trong đánh giá chất lượng phôi và khả năng phát triển phôi nang [96].

Số noãn chọc hút trung vị đạt 17 noãn (IQR: 13 - 23), phản ánh đáp ứng buồng trứng tốt trong đa số các chu kỳ. Đây là mức số noãn thường được xem là tối ưu trong IVF, cho tỷ lệ tạo phôi và có thai cao, giảm nguy cơ quá kích buồng trứng và ít biến chứng [97]. Kết quả này phù hợp với độ tuổi trung bình trẻ và BMI bình thường của quần thể nghiên cứu. Nhiều tác giả cho rằng số noãn thu được trong khoảng 15 - 20 là "cửa sổ tối ưu" giúp tối đa hóa số phôi nang và khả năng có thai mà không làm gia tăng các nguy cơ liên quan đến kích thích quá mức [97]. Số noãn ICSI trung vị là 13 noãn (IQR: 9 - 17), cho thấy tỷ lệ noãn trưởng thành MII tương đối cao. Việc áp dụng ICSI đồng nhất trong nghiên cứu giúp loại bỏ ảnh hưởng của các yếu tố liên quan đến thụ tinh tự nhiên và IVF cổ điển, đồng thời đảm bảo sự đồng nhất trong đánh giá tỷ lệ thụ tinh và phát triển của phôi. Đây là điểm mạnh về mặt phương pháp luận, đặc biệt khi nghiên cứu tập trung vào chất lượng và động học phát triển phôi nang.

Tỷ lệ thụ tinh trong nghiên cứu đạt 83,8%, cao hơn hoặc tương đương với nhiều báo cáo trong y văn quốc tế, vốn thường dao động từ 65 - 80% đối với ICSI [98]. Kết quả này phản ánh chất lượng noãn và tinh trùng tương đối tốt, cũng như quy trình thao tác ICSI ổn định và đồng nhất. Tỷ lệ thụ tinh cao là tiền đề quan trọng giúp thu được số lượng phôi đủ lớn để nuôi cấy phôi nang và phân tích sâu về hình thái cũng như động học phát triển của phôi. Tổng số phôi được nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang là 2522 phôi, trong đó 61% phát triển thành phôi nang. Tỷ lệ này được xem là khá cao, phù hợp với các nghiên cứu thực hiện trên quần thể bệnh nhân trẻ, đáp ứng buồng trứng tốt và có số noãn thu được tối ưu. Theo y văn, tỷ lệ phôi nang thường dao động từ 40 - 60% tùy thuộc vào tuổi người phụ nữ, chất lượng noãn và điều kiện

nuôi cấy [98]. Do đó, kết quả của nghiên cứu cho thấy điều kiện phòng thí nghiệm, môi trường nuôi cấy và quy trình theo dõi phôi đạt chất lượng tốt, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển liên tục của phôi đến giai đoạn phôi nang [99].

Quần thể nghiên cứu có độ đồng nhất cao về mặt đặc điểm lâm sàng, với tuổi trung bình trẻ và BMI ở mức bình thường, tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích sâu hơn mối quan hệ giữa các thông số phôi học và kết quả thai kỳ. Đáp ứng buồng trứng tốt, tỷ lệ thụ tinh cao và tỷ lệ phôi nang ấn tượng cho thấy quy trình kích thích buồng trứng và nuôi cấy phôi tại trung tâm đạt hiệu quả cao. Những kết quả này đặt nền tảng vững chắc cho các phân tích tiếp theo nhằm đánh giá ảnh hưởng của các biến phôi học cụ thể lên kết quả lâm sàng sau chuyển phôi.

3.1.2. Đặc điểm nền của bệnh nhân trong các chu kỳ chuyển phôi

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 511 phôi được chuyển ở 511 chu kỳ chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông, đáp ứng các tiêu chuẩn lựa chọn, loại trừ, và được đưa vào phân tích kết quả thai kỳ, xây dựng mô hình lựa chọn phôi làm tổ. Đặc điểm lâm sàng của các chu kỳ chuyển phôi được trình bày trong Bảng **3.2**.

Bảng 3.2. Đặc điểm bệnh nhân trong các chu kỳ chuyển phôi

Đặc điểm	Giá trị
Số chu kỳ chuyển phôi	511
Tuổi mẹ trung bình (năm) (mean ± SD)	30,5±4,9
AMH (ng/mL) (mean ± SD)	5,9 ± 4,2
AFC (n) (mean ± SD)	30,9 ±16,8
BMI mẹ (kg/m^2) (mean ± SD)	21,07 ± 2,54
Niêm mạc tử cung (mm) (mean ± SD)	9,5±1,2
Loại vô sinh (n, %) - Nguyên phát - Thứ phát	 287 (56,2%) 224 (43,8%)

Chú thích: Biến định lượng được mô tả bằng trung bình ± độ lệch chuẩn (mean ± Standard Deviation - SD); biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). AMH, Anti-mullerian Hormone, hormone dự trữ buồng trứng. AFC, Antral Follicle Count, số nang thứ cấp. BMI, Body Mass Index, chỉ số khối cơ thể

Nghiên cứu bao gồm 511 chu kỳ chuyển một phôi, phản ánh quy mô mẫu tương đối lớn, cho phép đánh giá đáng tin cậy mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng của người phụ nữ và kết quả điều trị hỗ trợ sinh sản. Tuổi trung bình của phụ nữ trong nghiên cứu là 30,5 ± 4,9 tuổi, cho thấy quần thể nghiên cứu chủ yếu thuộc nhóm

tuổi sinh sản trẻ. Đây là yếu tố thuận lợi, vì tuổi mẹ được xem là yếu tố tiên lượng mạnh mẽ nhất đối với kết quả IVF, ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng noãn, tỷ lệ lệch bội của phôi và khả năng làm tổ. Nhiều nghiên cứu gần đây khẳng định rằng ở nhóm phụ nữ dưới 35 tuổi, tỷ lệ phôi chuẩn bội và khả năng phát triển phôi nang cao hơn rõ rệt so với nhóm tuổi lớn hơn, đồng thời mối liên quan giữa các thông số phôi học và kết quả thai kỳ được thể hiện rõ ràng hơn [100,101]. Nhờ đó, việc phân tích và diễn giải vai trò của các yếu tố phôi học trong nghiên cứu trở nên đáng tin cậy.

Giá trị AMH trung bình 5,9 ± 4,2 ng/mL và AFC trung bình 30,9 ± 16,8 cho thấy phần lớn bệnh nhân có dự trữ buồng trứng tốt, thậm chí cao so với dân số IVF nói chung. Điều này phù hợp với tuổi trung bình trẻ của quần thể nghiên cứu. AMH và AFC được xem là các chỉ số phản ánh số lượng nang noãn tiềm năng và khả năng đáp ứng với kích thích buồng trứng. Các nghiên cứu gần đây cho thấy dự trữ buồng trứng cao có liên quan đến số lượng noãn thu được nhiều hơn và số phôi nang tạo ra lớn hơn, tuy nhiên không phải lúc nào cũng đồng nghĩa với tăng tỷ lệ làm tổ hay tỷ lệ trẻ sinh sống nếu không kiểm soát tốt chất lượng phôi và chiến lược chuyển phôi [102]. Trong bối cảnh này, việc nghiên cứu được thực hiện trên quần thể có dự trữ buồng trứng tốt giúp giảm nguy cơ thất bại do yếu tố chất lượng noãn, từ đó làm nổi bật vai trò của các yếu tố khác như chất lượng phôi, động học phát triển phôi nang và điều kiện niêm mạc tử cung đối với kết quả chuyển phôi. Đồng thời, nền tảng này cũng tạo điều kiện thuận lợi để đánh giá chính xác giá trị tiên lượng của các biến phôi học trong mô hình nghiên cứu.

Chỉ số BMI trung bình là 21,07 ± 2,54 kg/m², nằm trong giới hạn bình thường theo phân loại cho người châu Á. BMI được chứng minh là có ảnh hưởng đến nội tiết sinh sản, đáp ứng buồng trứng, cũng như môi trường nội mạc tử cung. Các nghiên cứu gần đây cho thấy béo phì và thừa cân có thể làm giảm tỷ lệ làm tổ và thai sinh sống, ngay cả khi chất lượng phôi tốt, thông qua các cơ chế liên quan đến viêm mạn tính, rối loạn chuyển hóa và thay đổi biểu hiện gen tại nội mạc tử cung [96]. Do đó, BMI trung bình bình thường trong nghiên cứu này là một yếu tố thuận lợi, giúp hạn chế tác động nhiễu của yếu tố chuyển hóa lên kết quả chuyển phôi, đồng thời góp phần tăng độ đồng nhất của quần thể nghiên cứu, qua đó, nâng cao độ tin cậy khi phân tích mối liên quan giữa các yếu tố phôi học và kết quả lâm sàng.

Độ dày niêm mạc tử cung trung bình tại thời điểm chuyển phôi là 9,5 ± 1,2 mm, nằm trong khoảng được xem là tối ưu cho quá trình làm tổ. Nhiều phân tích tổng hợp gần đây cho thấy niêm mạc tử cung mỏng (< 7 mm) có liên quan rõ rệt đến giảm tỷ lệ làm tổ, thai lâm sàng và trẻ sinh sống, trong khi niêm mạc trong khoảng 8 - 12

mm thường mang lại kết quả tốt nhất [103]. Như vậy, điều kiện nội mạc tử cung trong nghiên cứu tương đối thuận lợi, góp phần hỗ trợ khả năng tiếp nhận phôi và cải thiện kết quả thai trong các chu kỳ chuyển phôi đông lạnh hiện nay.

3.1.3. Đặc điểm phôi nang được chuyển

Tổng cộng có 511 phôi nang được chuyển trong 511 chu kỳ chuyển một phôi nang chu kỳ đông lạnh - rã đông được đưa vào phân tích trong nghiên cứu của chúng tôi. Đặc điểm phôi chuyển và kết quả lâm sàng của các chu kỳ chuyển phôi được trình bày trong Bảng **3.3**.

Bảng 3.3. Đặc điểm phôi trong các chu kỳ chuyển phôi

Đặc điểm	Giá trị: n (%)
Tuổi phôi	
Phôi ngày 5	460 (90%)
Phôi ngày 6	51 (10%)
Chất lượng hình thái phôi	
Rất tốt (RT)	293 (57,3%)
Tốt (T)	167 (32,7%)
Trung bình (TB)	51 (10%)
Độ nở phôi nang	
BL3	20 (3,91%)
BL4	53 (10,37%)
BL5	243 (47,55%)
BL6	161 (31,51%)
BL7	34 (6,66%)
Chất lượng ICM	
ICM A	352 (68,88%)
ICM B	113 (22,12%)
ICM C	46 (9%)
Chất lượng TE	
TE A	312 (61,06%)
TE B	157 (30,71%)
TE C	42 (8,23%)
Điểm EEVA	
E1	220 (43,05%)
E2	134 (26,22%)
E3	76 (14,87%)
E4	52 (10,18%)
E5	29 (5,68%)
Tỷ lệ làm tổ	343 (67,1 %)
Tỷ lệ thai lâm sàng	279 (54,6 %)
Tỷ lệ thai diễn tiến	254 (49,7 %)
Tỷ lệ trẻ sinh sống	230 (45 %)

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%), n: số lượng phôi. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi. TE: trophectoderm - tế bào lá nuôi. E: điểm EEVA - Early embryo viability assessment. BL: Blastocyst expansion - độ nở phôi

Trong nghiên cứu, 90% phôi được chuyển là phôi nang ngày 5, trong khi phôi nang ngày 6 chỉ chiếm 10%. Kết quả này phản ánh chiến lược lựa chọn phôi ưu tiên các phôi có tốc độ phát triển sớm để tăng tối đa tỷ lệ thành công ngay từ lần chuyển phôi đầu tiên. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng phôi nang ngày 5 có tiềm năng làm tổ và tỷ lệ sinh sống cao hơn so với phôi nang ngày 6, ngay cả khi chất lượng hình thái tương đương, do phôi phát triển sớm thường gắn liền với năng lực phát triển nội tại tốt hơn và tỷ lệ lệch bội thấp hơn [104,105]. Vì vậy, tỷ lệ phôi ngày 5 chiếm ưu thế trong nghiên cứu có thể góp phần nâng cao kết quả lâm sàng sau chuyển phôi.

Phần lớn phôi được chuyển có chất lượng hình thái tốt, trong đó 57,3% phôi được xếp loại rất tốt, 32,7% loại tốt và chỉ 10% loại trung bình. Phân bố này cho thấy chiến lược chọn lọc phôi nghiêm ngặt trước chuyển phôi, phù hợp với xu hướng chuyển đơn phôi nang nhằm tối ưu hóa khả năng có thai và giảm nguy cơ đa thai. Mặc dù đánh giá hình thái phôi nang vẫn mang tính chủ quan nhất định, nhiều phân tích tổng hợp gần đây khẳng định rằng phôi nang có hình thái tốt và rất tốt vẫn liên quan chặt chẽ với tỷ lệ làm tổ và kết cục trẻ sinh sống cao hơn so với phôi chất lượng trung bình hoặc kém, đặc biệt trong bối cảnh không thực hiện PGT-A [106]. Do đó, tỷ lệ phôi chất lượng cao chiếm ưu thế trong nghiên cứu này là yếu tố nền quan trọng góp phần vào kết quả thai kỳ tốt trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu hiện tại.

Xét về độ nở phôi nang, phần lớn phôi là BL5 (47,55%) và BL6 (31,51%), trong khi phôi ở giai đoạn sớm hơn (BL3 - BL4) và nở hoàn toàn (BL7) chiếm tỷ lệ thấp hơn. Đây là phân bố hợp lý trong thực hành lâm sàng, vì các phôi nang ở giai đoạn nở tiến triển (BL5 - BL6) thường được xem là thời điểm tối ưu để chuyển phôi hoặc đông lạnh. Các nghiên cứu gần đây cho thấy độ nở phôi nang có liên quan đến khả năng thoát màng trong suốt và tương tác với niêm mạc tử cung. Phôi nang có mức độ nở tốt (≥ BL5) thường có tỷ lệ làm tổ cao hơn so với phôi có độ nở kém (< BL3), đặc biệt trong các chu kỳ chuyển phôi rã đông [107,108]. Do đó, phân bố độ nở phôi nang trong nghiên cứu này phản ánh điều kiện sinh học thuận lợi cho quá trình làm tổ. Đồng thời, sự tập trung chủ yếu ở các giai đoạn phôi nang BL5 - BL6 cũng giúp giảm biến thiên về mức độ phát triển phôi tại thời điểm chuyển, qua đó tăng độ ổn định khi phân tích kết quả lâm sàng của các chu kỳ chuyển phôi.

Trong số các phôi được chuyển, 68,88% có ICM loại A, 22,12% loại B và chỉ 9% loại C. ICM là thành phần phát triển thành thai nhi, do đó được xem là yếu tố hình thái có ý nghĩa sinh học cao trong tiên lượng kết quả thai kỳ. Các nghiên cứu gần đây khẳng định rằng phôi nang có ICM loại A hoặc B có tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ trẻ sinh sống cao hơn đáng kể so với phôi có ICM loại C [109]. Tỷ lệ ICM loại A chiếm ưu thế trong nghiên cứu này cho thấy chất lượng phát triển phôi tốt và góp phần quan

trọng vào tỷ lệ thai diễn tiến và trẻ sinh sống tương đối cao được ghi nhận. Chất lượng TE trong nghiên cứu cũng cho thấy phân bố thuận lợi, với 61,06% TE loại A, 30,71% loại B và chỉ 8,23% loại C. TE đóng vai trò quyết định trong quá trình bám dính và xâm nhập của phôi vào nội mạc tử cung, do đó có ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ làm tổ sớm. Các bằng chứng gần đây cho thấy TE có thể là yếu tố hình thái liên quan chặt chẽ nhất với tỷ lệ làm tổ, thậm chí trong một số nghiên cứu còn có giá trị tiên lượng mạnh hơn ICM đối với kết quả thai lâm sàng [110,111]. Tỷ lệ TE loại A và B cao trong nghiên cứu này góp phần lý giải tỷ lệ làm tổ cao đạt được.

Theo hệ thống đánh giá EEVA dựa trên động học phát triển phôi, phần lớn phôi thuộc nhóm có điểm EEVA ngày 3 là E1 (43,05%) và E2 (26,22%), trong khi các nhóm phôi tiên lượng kém hơn (E4-E5) chỉ chiếm 15,86%. EEVA được phát triển nhằm cung cấp thông tin khách quan về khả năng phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang dựa trên các mốc thời gian phân chia tế bào, bổ sung cho đánh giá hình thái truyền thống. Các nghiên cứu gần đây cho thấy phôi thuộc nhóm có điểm EEVA ngày 3 là (E1-E2) có khả năng phát triển thành phôi nang tốt hơn và tỷ lệ làm tổ cao hơn đáng kể so với nhóm có điểm EEVA ngày 3 là E4-E5, đặc biệt trong các chu kỳ chuyển một phôi nang [9]. Phân bố điểm EEVA thuận lợi trong nghiên cứu này cho thấy sự phù hợp giữa đánh giá động học và hình thái phôi, góp phần nâng cao hiệu quả lựa chọn phôi. Đồng thời, sự phân bố này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước cho thấy việc kết hợp các thông số động học và phần mềm đánh giá phôi có thể góp phần cải thiện giá trị tiên lượng trong các mô hình dự báo kết quả làm tổ [9].

Nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ làm tổ 67,1%, tỷ lệ thai lâm sàng 54,6%, tỷ lệ thai diễn tiến 49,7% và tỷ lệ trẻ sinh sống 45%. Đây là các kết quả cao so với mặt bằng chung của nhiều báo cáo quốc tế, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi nang [112]. Những kết quả này có thể được giải thích bởi sự kết hợp của nhiều yếu tố thuận lợi, bao gồm: quần thể bệnh nhân trẻ, dự trữ buồng trứng tốt, điều kiện nội mạc tử cung phù hợp, tỷ lệ phôi ngày 5 cao, chất lượng hình thái phôi tốt và điểm EEVA tiên lượng thuận lợi. Các phân tích tổng hợp gần đây cho thấy khi hội tụ đầy đủ các yếu tố này, tỷ lệ trẻ sinh sống sau chuyển đơn phôi nang có thể đạt 40-50%, phù hợp với kết quả của nghiên cứu hiện tại [112,113]. Kết quả này đồng thời củng cố tính hợp lý của chiến lược lựa chọn phôi và quy trình nuôi cấy được áp dụng trong nghiên cứu.

3.2. Kết quả đánh giá phôi theo phần mềm EEVA

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ hình thành phôi nang được khảo sát và so sánh giữa năm nhóm EEVA khác nhau (E1-E5) trên tổng số 2522 phôi được nuôi kéo dài tới giai đoạn phôi nang, tỷ lệ hình thành phôi nang 61%, tổng số phôi nang là 1537.

3.2.1. Phân bố các nhóm EEVA và mối liên quan với chất lượng phôi nang

a. Tỷ lệ hình thành phôi nang theo phân độ EEVA

Bảng 3.4. Tỷ lệ hình thành phôi nang theo điểm EEVA

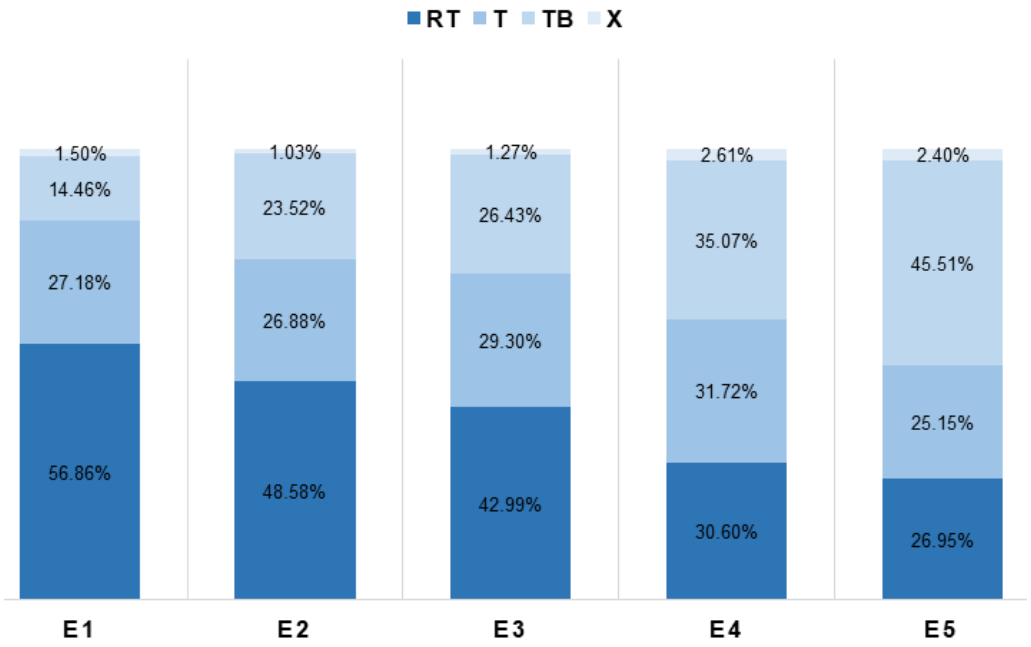
	Tỷ lệ hình thành phôi nang (%)	**Tổng (n)**
E1	86,6	401/463
E2	82,3	387/470
E3	67,7	314/464
E4	51,5	268/520
E5	27,6	167/605
Giá trị p	<0,001	

Chú thích: Dữ liệu phân loại được thể hiện dưới dạng phần trăm (%). E: Điểm EEVA, Early embryo viability assessment, Đánh giá khả năng sống của phôi ở giai đoạn sớm. Tỷ lệ phôi nang được so sánh giữa các điểm E khác nhau bằng kiểm định Chi-square. p < 0,05 sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điểm E. n: số lượng phôi

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ hình thành phôi nang được khảo sát và so sánh giữa năm nhóm EEVA khác nhau (E1 - E5) trên tổng số 2522 phôi. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ hình thành phôi nang giảm một cách có ý nghĩa thống kê khi chất lượng phôi theo phân loại EEVA giảm dần, với E1 đạt 86,6%, E2: 82,3%, E3: 67,7%, E4: 51,5% và E5 chỉ đạt 27,6% (p < 0,001), Bảng **3.4**. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu trước về hiệu quả của phần mềm EEVA [9,114]. Điều này cho thấy những thuật toán dựa trên động học phát triển phôi như phần mềm EEVA có khả năng dự đoán tốt tiềm năng hình thành phôi nang. Một nghiên cứu lâm sàng gần đây sử dụng hệ thống EEVA cũng cho thấy điểm EEVA thấp hơn (tương ứng với phôi có chất lượng tốt hơn) tương quan với tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn [9].

Điều này phản ánh mối liên quan giữa phân loại phôi theo hệ thống EEVA và khả năng phát triển tới giai đoạn phôi nang. Xu hướng giảm dần rõ rệt giữa các nhóm cho thấy hệ thống EEVA có khả năng phân tầng chất lượng phôi hiệu quả. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm chất lượng phôi không chỉ minh chứng cho hiệu quả của hệ thống phân loại trong việc tiên đoán khả năng hình thành phôi nang mà còn cho thấy ý nghĩa về giá trị lâm sàng của việc phân loại phôi theo các thuật toán phần mềm hỗ trợ như EEVA trong lựa chọn phôi để chuyển hoặc đông lạnh. Đồng thời, kết quả này còn cho thấy rằng việc ứng dụng các hệ thống đánh giá dựa trên động học có thể giúp giảm tính chủ quan so với đánh giá hình thái truyền thống. Việc tích hợp EEVA trong quy trình nuôi cấy có thể góp phần tối ưu hóa chiến lược lựa chọn phôi, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi ngày càng được khuyến khích.

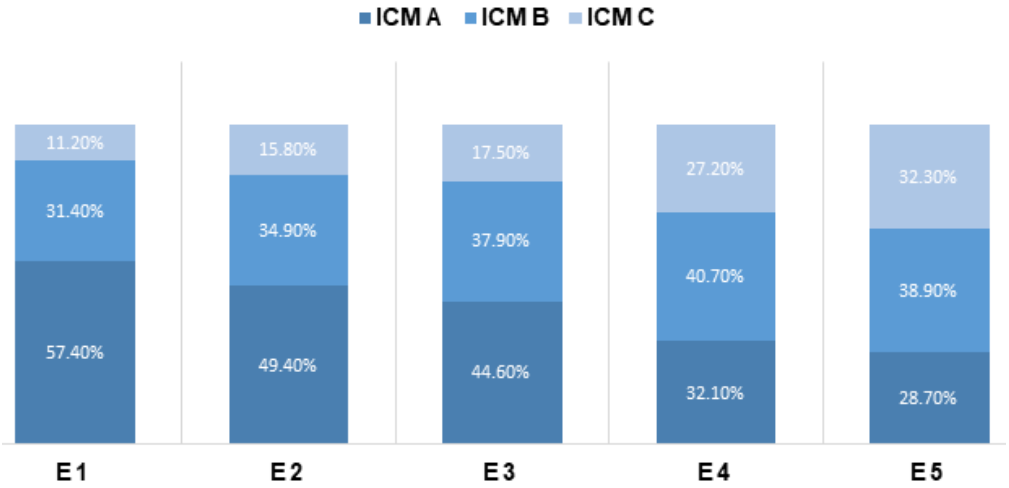
b. Phân bố các nhóm EEVA và mối liên quan với chất lượng phôi nang



Hình 3.1. Phân bố phân độ hình thái phôi nang trong từng điểm EEVA

RT: Rất tốt. T: Tốt. TB: Trung bình. X: Xấu. E: điểm EEVA

Hình **3.1** cho thấy ở nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), tỷ lệ phôi nang chất lượng loại rất tốt (RT) chiếm ưu thế với 56,86%, trong khi phôi nang loại tốt (T) và trung bình (TB) lần lượt là 27,18% và 14,46%, nhóm phôi nang xấu (X) chỉ chiếm 1,5%. Khi điểm EEVA tăng dần từ E2 đến E5, tỷ lệ phôi nang loại RT giảm rõ rệt, cụ thể: E2 (48,58%), E3 (42,99%), E4 (30,6%) và E5 chỉ còn 26,95%.

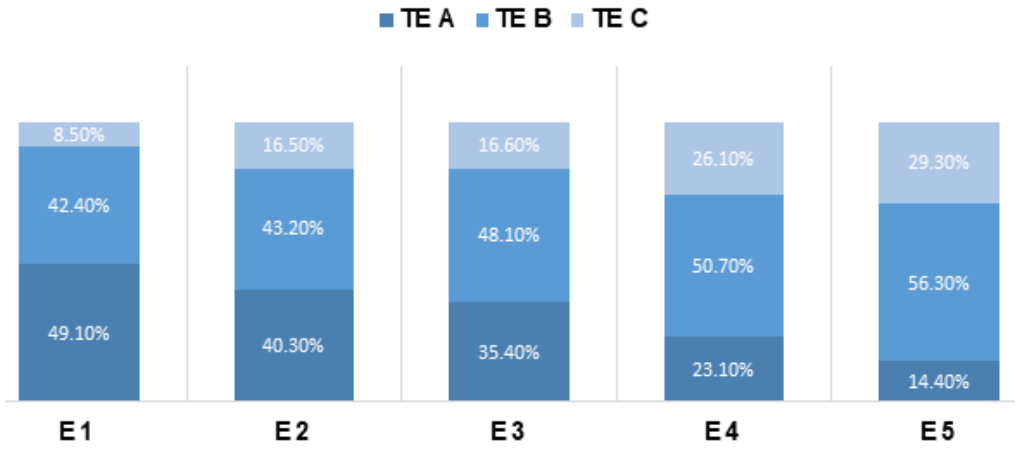


Hình 3.2. Phân bố chất lượng hình thái ICM trong từng điểm EEVA

ICM (inner cell mass): khối tế bào nội phôi. E: điểm EEVA

Hình **3.2** cho thấy ở nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), tỷ lệ ICM loại A chiếm ưu thế với 57,4%, trong khi ICM loại B và C lần lượt là 31,4% và

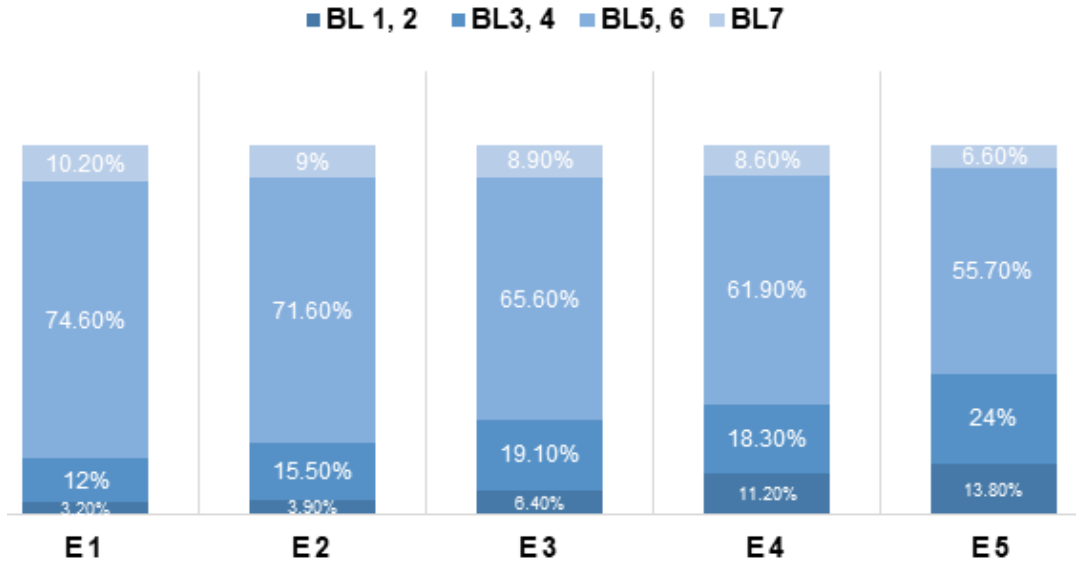
11,2%. Khi điểm EEVA tăng dần từ E2 đến E5, tỷ lệ phôi có ICM loại A cũng giảm theo, cụ thể: E2 (49,4%), E3 (44,6%), E4 (32,1%) và E5 chỉ còn 28,7%. Ngược lại, tỷ lệ ICM loại C (chất lượng kém) tăng rõ rệt, từ 11,2% (E1) lên 32,3% (E5).



Hình 3.3. Phân bố chất lượng hình thái TE trong từng điểm EEVA

TE (trophectoderm): lớp tế bào lá nuôi, E: điểm EEVA

Hình **3.3** cho thấy ở nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), tỷ lệ TE loại A chiếm ưu thế với 49,10%, trong khi TE loại B và C lần lượt là 32,40% và 8,50%. Khi điểm EEVA tăng dần từ E2 đến E5, tỷ lệ phôi có TE loại A cũng giảm theo, cụ thể: E2 (40,30%), E3 (35,40%), E4 (23,10%) và E5 chỉ còn 14,40%. Ngược lại, tỷ lệ TE loại C (chất lượng kém) tăng rõ rệt, từ 8,50% (E1) lên 29,30% (E5).



Hình 3.4. Phân bố hình thái mức độ giãn nở trong từng điểm EEVA

BL (blastocyst): độ nở của phôi nang, E: điểm EEVA

Hình **3.4** cho thấy ở nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), tỷ lệ phôi nang có độ nở tốt (BL3,4,5,6,7) chiếm ưu thế với 96,80%, trong khi độ nở loại BL 1,2 là 3,20%. Khi điểm EEVA tăng dần từ E2 đến E5, tỷ lệ phôi BL 3,4,5,6,7

cũng giảm theo, cụ thể: E2 (96,10%), E3 (93,60%), E4 (88,80%) và E5 chỉ còn 86,207%. Ngược lại, tỷ lệ phôi BL1,2 tăng rõ rệt, từ 3,20% (E1) lên 13,80% (E5).

Các kết quả trình bày tại Hình **3.1** đến **3.4** cho thấy mối liên quan chặt chẽ và có tính hệ thống giữa điểm EEVA và chất lượng hình thái phôi nang, bao gồm phân loại hình thái tổng thể, chất lượng khối tế bào nội phôi (ICM), chất lượng lớp tế bào nuôi (TE) cũng như mức độ nở của phôi nang. Xu hướng chung ghi nhận được là khi điểm EEVA ở ngày 3 tăng dần (tiên lượng kém dần), chất lượng hình thái phôi nang giảm một cách rõ rệt và nhất quán trên tất cả các tiêu chí đánh giá được khảo sát.

Kết quả từ Hình **3.1** cho thấy ở nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), tỷ lệ phôi nang loại rất tốt chiếm ưu thế tuyệt đối (56,86%), trong khi phôi loại xấu chỉ chiếm 1,5%. Khi điểm EEVA tăng dần từ E2 đến E5, tỷ lệ phôi rất tốt giảm rõ rệt, xuống còn 26,95% ở nhóm phôi có điểm E5. Ngược lại, tỷ lệ phôi trung bình và xấu tăng dần theo thang điểm EEVA. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu quốc tế cho thấy các thuật toán đánh giá phôi dựa trên động học phát triển, trong đó có phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA, phản ánh tương đối chính xác tiềm năng phát triển hình thái của phôi nang. Các phôi có động học phân chia tối ưu thường có khả năng vượt qua các mốc phát triển quan trọng như quá trình nén và quá trình hình thành khoang tốt hơn, từ đó tạo thành phôi nang với hình thái thuận lợi hơn [114].

Phân tích tại Hình **3.2** cho thấy tỷ lệ ICM A cao nhất ở nhóm E1 (57,4%) và giảm dần ở các nhóm E cao hơn, chỉ còn 28,7% ở nhóm E5. Ngược lại, tỷ lệ ICM C tăng gần gấp ba lần, từ 11,2% ở E1 lên 32,3% ở E5. ICM là thành phần phát triển thành thai nhi, do đó chất lượng ICM được xem là yếu tố then chốt quyết định khả năng làm tổ, thai diễn tiến và trẻ sinh sống. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng phôi nang có ICM A hoặc B có tỷ lệ làm tổ và sinh sống cao hơn đáng kể so với ICM C, ngay cả trong các chu kỳ chuyển đơn phôi nang và/hoặc phôi chuẩn bội [115]. Việc tỷ lệ ICM kém tăng dần theo điểm EEVA cho thấy EEVA không chỉ phản ánh khả năng hình thành phôi nang mà còn gián tiếp liên quan đến chất lượng ICM [114].

Tương tự, Hình **3.3** ghi nhận tỷ lệ TE A cao nhất ở nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA là E1 (49,1%) và giảm mạnh xuống còn 14,4% ở nhóm E5, trong khi tỷ lệ TE C tăng từ 8,5% lên 29,3%. TE đóng vai trò quan trọng trong quá trình làm tổ và hình thành nhau thai, do đó chất lượng TE được xem là một trong những yếu tố hình thái có giá trị tiên lượng cao đối với kết quả lâm sàng sau chuyển phôi, thậm chí các phân tích tổng hợp gần đây cho thấy chất lượng TE có mối liên quan chặt chẽ hơn với tỷ lệ sinh sống so với ICM, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi nang chu kỳ trữ lạnh [110,111]. Do đó, việc điểm EEVA tăng cao đi kèm với sự suy giảm rõ rệt chất

lượng TE càng củng cố giá trị tiên lượng lâm sàng của hệ thống đánh giá này.

Kết quả tại Hình **3.4** cho thấy đa số phôi ở nhóm E1 đạt mức độ nở tốt (BL3-BL7, chiếm 96,8%), trong khi tỷ lệ phôi có độ nở kém (BL1-2) chỉ 3,2%. Khi điểm EEVA tăng dần, tỷ lệ phôi có độ nở tốt giảm xuống còn 86,2% ở nhóm E5, đồng thời tỷ lệ BL1-2 tăng lên 13,8%. Mức độ nở phản ánh mức độ phát triển của khoang phôi và khả năng điều hòa áp lực thẩm thấu của phôi, là dấu hiệu quan trọng của sự trưởng thành phôi nang. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng phôi nang có mức độ nở cao hơn (BL ≥ 3) có tỷ lệ làm tổ và trẻ sinh sống cao hơn so với phôi nang nở kém, ngay cả khi đã kiểm soát các yếu tố khác như tuổi mẹ và chất lượng hình thái ICM/TE [82,83].

Các kết quả trên cho thấy điểm EEVA có mối liên quan chặt chẽ và nhất quán với toàn bộ đặc điểm chất lượng hình thái phôi nang. Điều này cho thấy EEVA không chỉ là công cụ dự báo khả năng hình thành phôi nang mà còn phản ánh chất lượng hình thái phôi nang, qua đó giúp hỗ trợ lựa chọn phôi chuyển trong thực hành lâm sàng, đặc biệt trong chiến lược chuyển đơn phôi nang để tối ưu hóa kết quả thai kỳ.

3.2.2. Giá trị tiên lượng của phần mềm EEVA với chất lượng phôi nang

Giá trị tiên lượng của phần mềm EEVA đối với chất lượng phôi nang được đánh giá bằng mô hình GEE đa biến, điều chỉnh các yếu tố gây nhiễu tiềm ẩn, bao gồm tuổi mẹ và tuổi phôi. Nghiên cứu sử dụng mô hình GEE nhằm hiệu chỉnh tương quan nội cụm giữa các phôi trong cùng bệnh nhân, qua đó đảm bảo các ước lượng thu được phản ánh đúng bản chất dữ liệu phôi học và có giá trị suy rộng ở mức quần thể [9,116]. Kết quả được trình bày dưới dạng tỷ số chênh hiệu chỉnh - *aOR*, kèm theo khoảng tin cậy 95% (95% CI - Confidence Interval) và giá trị p tương ứng, E1 được sử dụng làm nhóm tham chiếu.

a. Giá trị tiên lượng của EEVA với tỷ lệ hình thành phôi nang

Bảng 3.5. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và khả năng hình thành phôi nang

	Phôi nang		
Biến	**a*OR***	**95% CI**	**Giá trị p**
E2 vs E1	0,653	0,452 - 0,942	0,023
E3 vs E1	0,300	0,214 - 0,423	<0,001
E4 vs E1	0,151	0,109 - 0,210	<0,001
E5 vs E1	0,053	0,038 - 0,074	<0,001

Chú thích: aOR: Tỷ số chênh hiệu chỉnh; CI: Confidence Interval-Khoảng tin cậy; E: Điểm EEVA: Early embryo viability assessment - Đánh giá khả năng sống phôi giai đoạn sớm. p < 0,05 có ý nghĩa thống kê. GEE: Generalized Estimating Equations - Phương trình ước lượng tổng quát

Kết quả cho thấy so với nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 là E1, khả năng hình thành phôi nang giảm rõ rệt theo mức điểm EEVA tăng. Cụ thể, so với nhóm E1, nhóm E2 có aOR = 0,653 (95% CI: 0,452-0,942, p = 0,023), nhóm E3 có aOR = 0,300 (95% CI: 0,214-0,423; p < 0,001), nhóm E4 có aOR = 0,151 (95% CI: 0,109-0,210, p < 0,001), và nhóm E5 có aOR = 0,053 (95% CI: 0,038-0,074; p < 0,001).

Kết quả phân tích bằng mô hình GEE cho thấy mối liên hệ nghịch chiều rõ rệt và có ý nghĩa thống kê giữa điểm EEVA và xác suất hình thành phôi nang: điểm EEVA càng cao, khả năng phát triển thành phôi nang hoàn chỉnh càng giảm. Đáng chú ý, ở các nhóm E4 - E5, tỷ số chênh (aOR) hình thành phôi nang lần lượt là 0,151-0,053 so với nhóm E1 (Bảng **3.5**). Kết quả của chúng tôi tương đồng với các nghiên cứu về khả năng tiên lượng của EEVA [9,114,117]. Kết quả này củng cố giả thuyết rằng các thông số động học phân bào sớm, vốn là nền tảng của hệ thống EEVA, có giá trị tiên lượng quan trọng đối với khả năng phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang. Các nghiên cứu time-lapse gần đây cho thấy những phôi có thời gian phân chia từ 2 - 4 tế bào và sự đồng bộ của các chu kỳ phân bào sớm nằm trong "ngưỡng tối ưu" thường có tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn rõ rệt, trong khi các phôi lệch khỏi quỹ đạo động học này có tỷ lệ thất bại phát triển ở giai đoạn sau cao [42,118].

Phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi là phiên bản 3.1. Về cơ bản phiên bản EEVA này sử dụng các thông số tương tự như phiên bản trước nhưng đã bổ sung thêm một hạng mục trung gian mới bằng cách chia điểm phân loại nhỏ hơn, từ đó có khả năng tăng tính chọn lọc của phần mềm. Theo mô tả của Conaghan và cộng sự (2013), phiên bản đầu tiên của phần mềm EEVA có độ đặc hiệu 84,7% và độ nhạy 38,0% trong dự đoán phôi nang. Trong nghiên cứu nói trên, sự cải thiện đáng kể trong việc lựa chọn phôi đã được chứng minh khi các tiêu chí của phần mềm EEVA được thêm vào đánh giá hình thái học thông thường, cũng như mức độ biến thiên giữa các chuyên gia phôi học khác nhau giảm đi [44]. Phiên bản phần mềm EEVA này đã được Diamond và cộng sự (2015) xác nhận, cho thấy sự cải thiện về độ đặc hiệu dự đoán phôi nang từ 39% khi chỉ sử dụng các tiêu chí hình thái học, lên 76% khi kết hợp với phần mềm EEVA [64].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mối liên quan rõ rệt giữa điểm EEVA và khả năng phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang, tương đồng với các nghiên cứu xác nhận trước đây về hiệu quả của phần mềm EEVA. Aparicio-Ruiz và cộng sự (2016) khi xác nhận phiên bản thứ hai của phần mềm EEVA đã ghi nhận rằng các phôi được phân loại vào nhóm EEVA tốt có khả năng đạt được giai đoạn phôi nang cao hơn 2,014 lần so với các phôi thuộc nhóm EEVA kém [119]. Những phát hiện này cho thấy các đặc điểm động học phân chia sớm được EEVA khai thác

có giá trị tiên lượng thực sự đối với tiềm năng phát triển của phôi [119]. Phiên bản EEVA 3.1 trong nghiên cứu của chúng tôi có cùng thuật toán phân loại với phiên bản 2.3 [9], có bổ sung hai nhóm vào hệ thống phân loại (phôi chia 5 nhóm từ E1 đến E5). Kết quả cho thấy việc bổ sung thêm hai nhóm vào phân loại đã cải thiện hơn nữa độ nhạy của phần mềm. Các phôi được phân loại ở nhóm E1 có khả năng hình thành phôi nang cao hơn đáng kể so với các phôi ở nhóm E5 (aOR E5 vs E1: 0,053, CI: 0,038-0,074, p<0,001), khả năng này là cao hơn 15 lần ở nghiên cứu của Valera và cộng sự (2023) [9], trong khi chỉ quan sát thấy khả năng cao gấp 2 lần ở điểm E tốt so với điểm E kém của phiên bản EEVA thứ 2 [119]. Điều này cho thấy tính ổn định của thuật toán EEVA khi được áp dụng trên các quần thể nghiên cứu khác nhau và việc tinh chỉnh thuật toán và tăng mức độ phân tầng có thể giúp nâng cao độ nhạy trong đánh giá tiềm năng phát triển của phôi. Kết quả này cũng gợi ý rằng EEVA có thể đóng vai trò hữu ích khi kết hợp vào các mô hình tiên lượng đa biến trong IVF.

Việc áp dụng mô hình GEE là một điểm mạnh của nghiên cứu này, cho phép hiệu chỉnh sự tương quan nội tại giữa các phôi thuộc cùng một bệnh nhân, từ đó cung cấp các ước lượng với sai số chuẩn vững và kết luận thống kê đáng tin cậy hơn [116]. Cách tiếp cận này ngày càng được khuyến cáo trong các nghiên cứu IVF phân tích ở mức phôi, đặc biệt khi mỗi bệnh nhân đóng góp nhiều quan sát [9,116]. Việc sử dụng phương pháp này giúp hạn chế sai lệch do cấu trúc dữ liệu phân cụm và tăng độ chính xác của các ước lượng hiệu ứng. Đồng thời, điều này góp phần nâng cao giá trị suy luận và khả năng ứng dụng của kết quả nghiên cứu trong thực hành lâm sàng.

b. Giá trị tiên lượng của phần mềm EEVA với chất lượng phôi nang

Bảng 3.6. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và khả năng hình thành phôi nang có chất lượng rất tốt và tốt

	Phôi nang chất lượng rất tốt và tốt		
Biến	**a*OR***	**95% CI**	**Giá trị p**
E2 vs E1	0,584	0,410 - 0,831	0,003
E3 vs E1	0,496	0,344 - 0,713	<0,001
E4 vs E1	0,314	0,218 - 0,452	<0,001
E5 vs E1	0,207	0,138 - 0,309	<0,001

Chú thích: aOR: Tỷ số chênh hiệu chỉnh; CI: Confidence interval - Khoảng tin cậy; E: Điểm EEVA: Early embryo viability assessment - Đánh giá khả năng sống phôi giai đoạn sớm. p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Kết quả phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp phương trình ước lượng tổng quát, GEE: Generalized Estimating Equations

Từ bảng kết quả phân tích cho thấy, so với nhóm phôi ngày 3 được phần mềm EEVA chấm điểm E1, khả năng hình thành phôi nang có chất lượng hình thái là phôi loại rất tốt và tốt giảm rõ rệt khi điểm EEVA tăng. Cụ thể, nhóm phôi ngày 3 có điểm E2 có aOR = 0,584 (95% CI: 0,410-0,831, p = 0,003), nhóm phôi ngày 3 có điểm E3 có aOR = 0,496 (95% CI: 0,344-0,713; p < 0,001), nhóm phôi ngày 3 có điểm E4 có aOR = 0,314 (95% CI: 0,218-0,452; p < 0,001), và nhóm phôi ngày 3 có điểm E5 có aOR = 0,207 (95% CI: 0,138-0,309; p < 0,001). Kết quả này cho thấy có mối liên hệ nghịch chiều có ý nghĩa thống kê giữa điểm EEVA và khả năng hình thành phôi nang có chất lượng hình thái là phôi tốt và rất tốt: ngày 3 được chấm điểm EEVA càng cao (tiên lượng càng kém), thì xác suất phôi phát triển thành phôi nang được đánh giá về hình thái là phôi rất tốt và tốt càng giảm mạnh. Đặc biệt, ở nhóm phôi ngày 3 được chấm điểm E5, tỷ số chênh hiệu chỉnh (aOR) hình thành phôi nang có chất lượng hình thái rất tốt và tốt bằng 0,2 lần so với nhóm phôi có điểm E1.

Bảng 3.7. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và chất lượng hình thái ICM (ICM loại A và ICM loại C)

	ICM A			**ICM C**		
Biến	**a*OR***	**95% CI**	**p**	**a*OR***	**95% CI**	**p**
E2 vs E1	0,725	0,547-0,959	0,025	1,480	0,979-2,238	0,063
E3 vs E1	0,598	0,444-0,806	0,001	1,680	1,098-2,570	0,017
E4 vs E1	0,351	0,254-0,486	<0,001	2,962	1,965-4,465	<0,001
E5 vs E1	0,300	0,203-0,443	<0,001	3,781	2,414-5,921	<0,001

Chú thích: ICM: Inner cell mass - Khối tế bào nội phôi; aOR: Tỷ số chênh hiệu chỉnh; CI: Confidence interval - Khoảng tin cậy; E: Điểm EEVA; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE - Generalized Estimating Equations

Kết quả Bảng **3.7** cho thấy, đối với kết quả là ICM loại A, so với nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA là E1, các nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn (E2 đến E5) đều có xu hướng giảm đáng kể về khả năng hình thành ICM loại A: E2: aOR = 0,725; 95% CI: 0,547-0,959; p = 0,025, E3: aOR = 0,598; 95% CI: 0,444-0,806; p = 0,001, E4: aOR = 0,351; 95% CI: 0,254-0,486; p < 0,001 và E5: aOR = 0,300; 95% CI: 0,203-0,443; p < 0,001. Kết quả này phản ánh mối liên hệ nghịch chiều rõ rệt và có ý nghĩa thống kê, trong đó phôi có điểm EEVA ngày 3 càng cao (khả năng sống

được đánh giá càng thấp), thì khả năng phôi hình thành ICM chất lượng cao càng suy giảm. Đặc biệt, nhóm có điểm E4 và E5, aOR hình thành ICM A lần lượt là 0,35 và 0,3 so với nhóm E1.

Ngược lại, phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn lại có mối liên hệ thuận chiều với khả năng hình thành ICM loại C, với mức tăng có ý nghĩa thống kê từ E3 đến E5: E2: aOR = 1,480; 95% CI: 0,979-2,238; p = 0,063, E3: aOR = 1,680; 95% CI: 1,098-2,570; p = 0,017, E4: aOR = 2,962; 95% CI: 1,965-4,465; p < 0,001 và E5: aOR = 3,781; 95% CI: 2,414-5,921; p < 0,001. Mặc dù nhóm E2 chưa đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê (p = 0,063), xu hướng gia tăng hình thành ICM loại C vẫn được ghi nhận. Từ nhóm E3 trở đi, mức tăng trở nên rõ rệt và có ý nghĩa thống kê, đặc biệt ở nhóm E4 và E5, aOR hình thành ICM loại C lần lượt là 2,96 và 3,78 so với nhóm E1.

Kết quả này cho thấy điểm EEVA không chỉ liên quan đến khả năng phát triển phôi nang mà còn phản ánh chất lượng biệt hóa của khối tế bào nội phôi ICM, thành phần trực tiếp phát triển thành thai nhi. Sự phân tầng rõ rệt giữa các nhóm EEVA cho thấy rằng các chỉ số động học sớm có thể dự báo gián tiếp tiềm năng phát triển phôi về mặt hình thái ở giai đoạn muộn, đặc biệt là chất lượng ICM.

Bảng 3.8. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và chất lượng hình thái TE (TE loại A và TE loại C)

	TE A			**TE C**		
Biến	**a*OR***	**95% CI**	**p**	**a*OR***	**95% CI**	**p**
E2 vs E1	0,699	0,527-0,927	0,013	2,139	1,375-3,328	0,001
E3 vs E1	0,566	0,418-0,767	<0,001	2,142	1,352-3,395	0,001
E4 vs E1	0,312	0,221-0,440	<0,001	3,861	2,446-5,953	<0,001
E5 vs E1	0,174	0,108-0,279	<0,001	4,482	2,762-7,274	<0,001

Chú thích: TE: Trophectoderm - tế bào lá nuôi; aOR: Tỷ số chênh hiệu chỉnh; CI: Confidence Interval - Khoảng tin cậy; E: Điểm EEVA, Đánh giá khả năng sống phôi giai đoạn sớm. p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE - Generalized Estimating Equations

Kết quả Bảng **3.8** cho thấy, đối với kết quả là TE loại A, so với nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA là E1, các nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn (E2 đến E5) đều có nguy cơ giảm rõ rệt trong việc đạt được TE loại A: E2: aOR = 0,699; 95%

CI: 0,527-0,927; p = 0,013, E3: aOR = 0,566; 95% CI: 0,418-0,767; p < 0,001, E4: aOR = 0,312; 95% CI: 0,221-0,440; p < 0,001 và E5: aOR = 0,174; 95% CI: 0,108-0,279; p < 0,001. Kết quả này cho thấy mối liên hệ nghịch chiều rõ rệt và có ý nghĩa thống kê giữa điểm EEVA và chất lượng TE loại A: khi phôi có điểm EEVA ngày 3 càng cao (nghĩa là đánh giá khả năng sống của phôi càng kém), khả năng phôi phát triển đến mức có TE chất lượng cao (loại A) càng giảm mạnh.

Ngược lại, phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn lại có liên quan thuận đáng kể với khả năng hình thành TE loại C: E2: aOR = 2,139; 95% CI: 1,375-3,328; p = 0,001, E3: aOR = 2,142; 95% CI: 1,352-3,395; p = 0,001, E4: aOR = 3,861; 95% CI: 2,446-5,953; p < 0,001, E5: aOR = 4,482; 95% CI: 2,762-7,274; p < 0,001. Tỷ số chênh hiệu chỉnh tăng dần theo mức điểm EEVA, đặc biệt nổi bật ở nhóm E4 và E5, cho thấy rằng phôi ngày 3 có EEVA cao (E4-E5) (là loại có chất lượng kém và tiên lượng lâm sàng thấp) có aOR hình thành lớp TE loại C lần lượt là 3,86 và 4,48 so với E1.

Bảng 3.9. Mô hình GEE đánh giá mối liên quan giữa điểm EEVA và mức độ giãn nở của phôi nang (BL>2)

	BL 3, 4, 5, 6, 7		
Biến	**a*OR***	**95% CI**	**p**
E2 vs E1	0,831	0,390-1,770	0,631
E3 vs E1	0,493	0,241-1,006	0,050
E4 vs E1	0,266	0,136-0,520	<0,001
E5 vs E1	0,210	0,103-0,425	<0,001

Chú thích: BL: Blastocyst expansion, Độ nở phôi nang; aOR: Adjusted odd ratio, Tỷ số chênh hiệu chỉnh; CI: Confidence Interval - Khoảng tin cậy; E: Điểm EEVA, Đánh giá khả năng sống phôi giai đoạn sớm. p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE - Generalized Estimating Equations

Kết quả Bảng **3.9** cho thấy, so với nhóm E1, các nhóm E2 và E3 có xu hướng giảm khả năng đạt mức độ nở rộng phôi nang BL3,4,5,6,7, E2 (aOR=0,831; 95% CI: 0,390-1,770; p = 0,631), tuy nhiên chỉ nhóm E3 tiệm cận ngưỡng ý nghĩa thống kê (aOR = 0,493; 95% CI: 0,241-1,006; p = 0,050). Trong khi đó, các nhóm E4 và E5 có mối liên hệ nghịch rõ rệt và có ý nghĩa thống kê với khả năng đạt mức độ nở rộng phôi nang BL 3,4,5,6,7: E4 với aOR = 0,266 (95% CI: 0,136-0,520; p < 0,001) và E5 với aOR = 0,210 (95% CI: 0,103-0,425; p < 0,001). Các kết quả này cho thấy rằng, khi điểm EEVA càng cao (tức là đánh giá khả năng sống phôi càng kém theo EEVA), thì khả năng phôi đạt được mức độ nở rộng phôi nang tốt càng giảm rõ rệt.

Phân tích mối liên quan giữa điểm EEVA và các đặc điểm phát triển của phôi nang bằng mô hình hồi quy GEE cho thấy điểm EEVA có liên quan chặt chẽ, nhất quán và có ý nghĩa thống kê với chất lượng phôi nang ở nhiều khía cạnh, bao gồm khả năng hình thành phôi nang chất lượng rất tốt/tốt (Bảng **3.6**), chất lượng hình thái ICM (Bảng **3.7**), TE (Bảng **3.8**), cũng như độ nở của phôi nang (Bảng **3.9**)

Về khả năng hình thành phôi nang chất lượng rất tốt và tốt, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận xu hướng giảm rõ rệt theo sự gia tăng của điểm EEVA. So với phôi ở nhóm có điểm EEVA ngày 3 tốt nhất (E1), các phôi thuộc các nhóm có điểm EEVA cao hơn có aOR giảm có ý nghĩa thống kê (Bảng **3.6**), cho thấy các sai lệch động học phân chia sớm được phản ánh qua EEVA có liên quan đến chất lượng hình thái phôi nang. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu time-lapse trước đây, trong đó các thông số động học sớm như thời điểm phân chia và độ đồng bộ của chu kỳ tế bào được chứng minh có liên quan đến khả năng hình thành phôi nang và chất lượng phôi ở giai đoạn muộn hơn [120,121]. Thời điểm phân chia thành hai tế bào (t2) >29,1 giờ sau ICSI và thời điểm phân chia thành bốn tế bào (t4) > 41,3 giờ sau ICSI cho thấy tỷ lệ hình thành phôi nang thấp nhất [121].

Khi phân tích chất lượng ICM, điểm EEVA cho thấy mối liên quan nghịch chiều với khả năng hình thành ICM A và liên quan thuận chiều với nguy cơ xuất hiện ICM C, đặc biệt rõ ở các mức EEVA cao. So với nhóm EEVA tốt nhất (E1), các phôi thuộc các nhóm EEVA cao hơn có aOR giảm có ý nghĩa thống kê về khả năng hình thành ICM A, aOR tăng có ý nghĩa thống kê về khả năng hình thành ICM C (Bảng **3.7)**. ICM là tiền thân trực tiếp của thai nhi và được xem là cấu trúc phản ánh tiềm năng phát triển nội tại của phôi. Các nghiên cứu gần đây cho thấy chất lượng ICM có mối liên quan độc lập với tỷ lệ thai lâm sàng, thai diễn tiến và trẻ sinh sống, ngay cả khi đã hiệu chỉnh theo chất lượng TE và mức độ nở của phôi nang [111,122]. Do đó, mối liên quan giữa EEVA và chất lượng ICM trong nghiên cứu này củng cố thêm giá trị tiên lượng kết quả thai kỳ của các đặc điểm động học sớm.

Đối với chất lượng TE, tương tự như ICM, kết quả cho thấy điểm EEVA có mối liên quan nhất quán với chất lượng TE, trong đó khả năng hình thành TE A giảm dần và nguy cơ TE C tăng lên theo sự gia tăng của điểm EEVA (Bảng **3.8)**. TE là cấu trúc đóng vai trò trung tâm trong quá trình làm tổ và hình thành nhau thai sớm, đồng thời phản ánh năng lực tăng sinh và tổ chức tế bào của phôi. Các nghiên cứu ứng dụng phần mềm phân tích dữ liệu time-lapse cho thấy các đặc điểm động học phân chia sớm có khả năng dự đoán chất lượng TE với độ chính xác cao, và TE thường là thành phần được dự đoán ổn định hơn so với ICM [111].

Đối với mức độ nở của phôi nang, mối liên quan với điểm EEVA chỉ được ghi nhận rõ rệt ở các mức EEVA cao. Ở các mức EEVA thấp và trung gian, mối liên quan này không rõ rệt hoặc chỉ thể hiện xu hướng (Bảng **3.9**). Nhiều nghiên cứu trước đây đã chứng minh động học phân chia phôi sớm có mối liên quan chặt chẽ với khả năng hình thành và mức độ nở của phôi nang. Phôi có thời điểm phân chia sớm (tPNf, t2, t3, t4) và khoảng thời gian chu kỳ tế bào đồng bộ (cc2, s2) thường có xu hướng phát triển thành phôi nang với mức độ nở cao hơn so với các phôi có động học bất thường [7,10,68]. Ngoài ra, nhiều mô hình tiên lượng dựa trên động học phân chia phôi (như KIDScore™) cho thấy điểm số động học cao không chỉ dự đoán khả năng hình thành phôi nang mà còn liên quan đến mức độ nở phôi nang [7]. Động học giai đoạn phôi phân chia phản ánh khả năng phát triển của phôi nang, độ nở phôi nang.

Ngoài ra, mối liên quan giữa điểm EEVA với ICM, TE và mức độ nở của phôi nang cho thấy các thông số động học sớm có thể phản ánh toàn diện năng lực phát triển của phôi ở giai đoạn muộn. Xu hướng giảm chất lượng phôi nang theo sự gia tăng điểm EEVA được ghi nhận nhất quán qua nhiều chỉ số, củng cố tính giá trị của EEVA trong phân tầng tiềm năng phát triển phôi. Việc các kết quả vẫn giữ ý nghĩa thống kê sau khi hiệu chỉnh bằng mô hình GEE cho thấy mối liên quan này không bị ảnh hưởng đáng kể bởi hiện tượng phân cụm theo bệnh nhân.

Tóm lại, các kết quả của nghiên cứu cho thấy điểm EEVA ở phôi ngày 3 có mối liên quan với chất lượng phôi nang ở nhiều khía cạnh khác nhau, và các mối liên quan này vẫn được duy trì sau khi hiệu chỉnh tương quan nội tại giữa các phôi bằng mô hình GEE. Kết quả này phù hợp với xu hướng nghiên cứu hiện nay về ứng dụng time-lapse và các phần mềm đánh giá phôi trong hỗ trợ sinh sản, đồng thời cho thấy phần mềm tự động đánh giá phôi EEVA có thể được sử dụng như một công cụ hỗ trợ trong đánh giá và lựa chọn phôi bên cạnh các tiêu chí hình thái truyền thống.

3.3. Kết quả mối liên quan giữa các thông số động học và chất lượng hình thái của phôi nang

Trong nghiên cứu của chúng tôi, đặc điểm phôi chuyển, số lượng phôi trong mỗi phân nhóm (phân độ hình thái, chất lượng hình thái ICM, TE, và độ nở) được trình bày trong Bảng **3.3**. Chúng tôi khảo sát mối liên hệ giữa các thông số động học hình thái với chất lượng phôi chuyển bao gồm: phân độ hình thái phôi, hình thái ICM, hình thái TE, độ nở phôi. Các mối liên hệ này trước hết dựa trên so sánh sự khác biệt về giá trị trung vị của các biến số là thông số động học giữa các phân nhóm. Các thông số động học được trình bày dưới dạng trung vị (Q1 - Q3). Do dữ liệu không tuân theo phân phối chuẩn, kiểm định phi tham số Kruskal-Wallis được sử dụng để

so sánh sự khác biệt giữa ba nhóm: nhóm phân độ hình thái phôi (Rất tốt, Tốt, Trung bình) Bảng **3.10**; nhóm hình thái khối tế bào ICM (A, B, C) Bảng **3.11**; nhóm hình thái lớp tế bào TE (A,B,C) Bảng **3.12**; nhóm độ nở phôi nang (BL3,4 và BL5,6,7) Bảng **3.13**, kèm theo phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định phi tham số Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni. Cách tiếp cận này cho phép đánh giá chi tiết sự khác biệt của từng thông số động học giữa các mức chất lượng phôi, từ đó nhận diện các mốc thời gian có ý nghĩa sinh học và lâm sàng**.** Kết quả phân tích góp phần làm rõ vai trò của từng thông số động học trong mối liên hệ với đặc điểm hình thái và khả năng phát triển của phôi, hỗ trợ định hướng lựa chọn phôi chuyển tối ưu.

Bảng 3.10. Mối liên quan giữa các thông số động học và phân độ hình thái phôi

Thông số (Giờ)	Rất tốt (RT) (n=293)	Tốt (T) (n=167)	Trung bình (TB) (n=51)	Giá trị p (p1, p2, p3)
tSC	65,00 (59,00-72,00)	72,00 (62,00-79,40)	76,05 (66,50-85,00)	0,001, 0,001, 0,012
tM	81 (75,35-85,75)	85,00 (80,10-91,05)	90,15 (83,20-98,15)	0,001, 0,001, 0,002
tSB	94,55 (90,15-98,10)	96,45 (93,45-101,30)	102,30 (96,05-108,45)	0,001, 0,001, 0,001
tBL2	100,25 (96,30-104,18)	104,00 (99,25-109,10)	109,00 (102,00-118,30)	0,001, 0,001, 0,001
tB	104,00 (99,55-108,15)	108,00 (102,30-112,40)	116,00 (105,00-124,55)	0,001, 0,001, 0,001

Chú thích: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung vị (median) khoảng tứ phân vị (interquartile range IQR, Q1-Q3). Kiểm định Kruskal-Wallis được sử dụng do dữ liệu không phân phối chuẩn, sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa ba nhóm phân độ chất lượng phôi, kèm theo phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni, so sánh từng cặp với nhau, giá trị p từng cặp: p1(RT,T), p2 (RT,TB), p3 (T,TB). Giá trị p *< 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy*

Kết quả Bảng **3.10** cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm phân độ hình thái phôi nang ở tất cả các mốc thời gian động học. Cụ thể: thời điểm tSC ở nhóm RT là 65,00 giờ (59,00-72,00), sớm hơn đáng kể so với nhóm T (72,00 giờ; 62,00-79,40; *p1*= 0,001) và nhóm TB (76,05 giờ; 66,50-85,00; *p2* = 0,001). Sự khác biệt giữa nhóm T và nhóm TB cũng có ý nghĩa thống kê (*p3* = 0,012). Thời điểm tM cũng xảy ra sớm hơn ở nhóm RT (81,00 giờ (75,35-85,75) so với nhóm T (85,00 giờ (80,10-91,05); *p1* = 0,001) và TB (90,15 giờ (83,20-98,15); *p2* = 0,001), với sự khác biệt giữa T và TB đạt mức ý nghĩa (*p3* = 0,002). Thời điểm tSB, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, lần lượt là phôi RT là 94,55 giờ (90,15-98,10), phôi

T là 96,45 giờ (93,45-101,30) và phôi TB là 102,30 giờ (96,05-108,45), với các giá trị của *p* đều < 0,001. Thời điểm tBL2 và tB, cũng cho thấy xu hướng xảy ra sớm hơn đáng kể, có ý nghĩa thống kê ở nhóm có chất lượng phân độ cao. tBL2 ở nhóm RT là 100,25 giờ (96,30-104,18), sớm hơn nhóm T là 104,00 giờ (99,25-109,10) và nhóm phôi TB là 109,00 giờ (102,00-118,30); tB ở nhóm RT là 104,00 giờ (99,55-108,15) so với 108,00 giờ (102,30-112,40) ở nhóm T và 116,00 giờ (105,00-124,55) ở nhóm TB. Tất cả so sánh đều có ý nghĩa thống kê cao (*p1, p2, p3* < 0,005).

Bảng 3.11. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái ICM

Thông số (Giờ)	ICM A (n=352)	ICM B (n=113)	ICM C (n=46)	Giá trị p (p1, p2, p3)
tSC	65,02 (59,27-73,15)	73,00 (62,77-81,18)	74,73 65,35-85,03)	0,001, 0,001, 0,147
tM	81,22 (76,00-86,88)	86,00 (81,00-92,00)	90,08 (83,15-96,80)	0,001, 0,001, 0,058
tSB	95,03 (90,41-98,15)	98,1 (94,03-103,10)	101,40 (95,88-108,18)	0,001, 0,001, 0,147
tBL2	101,00 (96,55-104,39)	105,40 (100,00-110,20)	109,63 (101,39-116,65)	0,001, 0,001, 0,004
tB	104,25 (100,20-108,39)	109,00 (102,17-114,10)	115,50 (103,93-123,58)	0,001, 0,001, 0,002

Chú thích: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung vị (median) khoảng tứ phân vị (interquartile range IQR, Q1 - Q3). Kiểm định Kruskal-Wallis được sử dụng do dữ liệu không phân phối chuẩn, sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa ba nhóm ICM, kèm theo phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni, so sánh từng cặp với nhau, giá trị p từng cặp ICM: cặp ICM loại A và B là p1, ICM loại A và C là p2, ICM loại B và C là p3. Giá trị p *< 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi*

Kết quả Bảng **3.11** cho thấy phần lớn các thông số động học có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm chất lượng ICM. Cụ thể, thời điểm tSC có sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm ICM A (65,02 giờ; Q1-Q3: 59,27-73,15) và nhóm ICM B (73,00 giờ; Q1-Q3: 62,77-81,18; p1 = 0,001), cũng như giữa nhóm ICM A và nhóm ICM C (74,73 giờ; Q1-Q3: 65,35-85,03; p2 = 0,001). Tuy nhiên, sự khác biệt giữa nhóm ICM B và ICM C không có ý nghĩa thống kê (p3 = 0,147). Tương tự, thời điểm tM ở nhóm ICM A (81,22 giờ; Q1-Q3: 76,00-86,88) thấp hơn đáng kể, có ý nghĩa thống kê khi so với nhóm ICM B (86,00 giờ; Q1-Q3: 81,00-92,00; p1 = 0,001) và nhóm ICM C (90,08 giờ; Q1-Q3: 83,15-96,80; p2 = 0,001), trong khi sự khác biệt giữa nhóm ICM B và ICM C gần đạt ngưỡng có ý nghĩa thống kê (p3 = 0,058). Thời điểm

tSB và tBL2 cũng cho thấy xu hướng tăng dần theo mức độ giảm chất lượng ICM. Cụ thể, tBL2 ở nhóm ICM A (101,00 giờ, Q1-Q3: 96,55-104,39), thấp hơn rõ rệt, có ý nghĩa thống kê so với nhóm ICM B (105,40 giờ; Q1-Q3: 100,00-110,20; p1 = 0,001) và nhóm ICM C (109,63 giờ; Q1-Q3: 101,39-116,65; p2 = 0,001; p3 = 0,004). Thời điểm tB cũng phản ánh sự khác biệt tương tự, nhóm ICM A đạt tB sớm nhất (104,25 giờ; Q1-Q3: 100,20-108,39), so với nhóm ICM B (109,00 giờ; Q1-Q3: 102,17-114,10; p1 = 0,001) và nhóm ICM C (115,50 giờ; Q1-Q3: 103,93-123,58; p2 = 0,001; p3 = 0,002).

Bảng 3.12. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái TE

Thông số (giờ)	TE A (n=312)	TE B (n=157)	TE C (n=42)	Giá trị p (p1; p2; p3)
tSC	65,03 (59,04-72,50)	72,05 (62,18-80,40)	73,28 (66,24-84,59)	0,001; 0,001; 0,099
tM	81,00 (75,67-86,19)	86,00 (80,78-91,43)	88,70 (82,79-97,03)	0,001; 0,001; 0,084
tSB	94,53 (90,11-98,09)	97,40 (94,08-102,78)	101,23 (95,88-107,54)	0,001; 0,001; 0,017
tBL2	100,20 (96,26-104,13)	105,00 (100,30-109,73)	107,89 (101,39-117,95)	0,001; 0,001; 0,009
tB	103,53 (99,51-108,13)	108,25 (103,53-113,40)	113,05 (103,93-124,69)	0,001; 0,001; 0,015

Chú thích: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung vị (median) khoảng tứ phân vị (interquartile range IQR, Q1-Q3). Kiểm định Kruskal-Wallis được sử dụng do dữ liệu không phân phối chuẩn, sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa ba nhóm TE, kèm theo phân tích hậu kiểm từng cặp bằng kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni, so sánh từng cặp với nhau, giá trị p từng cặp TE: cặp TE loại A và B là p1, TE loại A và C là p2, TE loại B và C là p3. Giá trị $p < 0,05$ *được xem là có ý nghĩa thống kê. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi*

Kết quả Bảng **3.12** cho thấy hầu hết các thông số động học đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm TE, đặc biệt giữa nhóm TE A với TE B và TE A với TE C. Cụ thể: tSC: Trung vị của nhóm TE A là 65,03 giờ (Q1-Q3: 59,04-72,50), thấp hơn đáng kể so với nhóm TE B (72,05 giờ; 62,18-80,40; p1 = 0,001) và nhóm TE C (73,28 giờ; 66,24-84,59; p2 = 0,001). Xu hướng tăng khi so sánh nhóm TE B và TE C, tuy nhiên sự khác biệt giữa nhóm TE B và TE C không đạt ngưỡng ý nghĩa thống kê (p3 = 0,099). Thời điểm tM: Tương tự, nhóm TE A đạt mốc này sớm nhất (81,00 giờ; 75,67-86,19), so với nhóm TE B (86,00 giờ; 80,78-91,43; p1 = 0,001) và nhóm TE C (88,70 giờ; 82,79-97,03; p2 = 0,001), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

So sánh giữa nhóm TE B và TE C sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p3 = 0,084). Thời điểm tSB, thông số này tiếp tục phản ánh xu hướng phát triển sớm hơn ở phôi có TE A. Cụ thể, TE ở nhóm A là 94,53 giờ (90,11-98,09), thấp hơn đáng kể có ý nghĩa thống kê khi so với nhóm TE B (97,40 giờ; 94,08-102,78; p1 = 0,001) và nhóm TE C (101,23 giờ; 95,88-107,54; p2 = 0,001). Sự khác biệt giữa nhóm B và C ở mức có ý nghĩa thống kê (p3 = 0,017), cho thấy tSB có thể là một dấu hiệu phân biệt rõ giữa các nhóm TE. Thời điểm tBL2 (thời điểm khoang >1/2 thể tích phôi) cũng cho thấy sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm: nhóm A đạt mốc này tại 100,20 giờ (96,26-104,13), thấp hơn nhóm B (105,00 giờ; 100,30-109,73; p1 = 0,001) và nhóm C (107,89 giờ; 101,39-117,95; p2 = 0,001; p3 = 0,009). Thời điểm tB: Sự khác biệt về trung vị giữa các nhóm có ý nghĩa thống kê, phôi thuộc nhóm A phát triển nhanh hơn (103,53 giờ; 99,51-108,13) so với nhóm B (108,25 giờ; 103,53-113,40; p1 = 0,001) và nhóm C (113,05 giờ; 103,93-124,69; p2 = 0,001; p3 = 0,015).

Bảng 3.13. Mối liên quan giữa các thông số động học và hình thái độ nở phôi

Thông số (giờ)	BL 3,4 (n=73)	BL 5,6,7 (n=438)	Giá trị p
tSC	72,00 (62,00-83,00)	66,43 (60,04-75,44)	0,002
tM	85,40 (78,35-92,15)	82,32 (77,23-88,06)	0,020
tSB	97,35 (93,50-105,05)	95,35 (91,25-99,21)	0,003
tBL2	105,10 (100,08-112,00)	101,30 (97,30-106,30)	0,001
tB	108,05 (103,15-115,48)	105,00 (100,44-110,06)	0,001

Chú thích: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung vị (median) khoảng tứ phân vị (interquartile range IQR, Q1-Q3). Kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni được sử dụng do dữ liệu không phân phối chuẩn, sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa 2 nhóm độ nở phôi. Giá trị p *< 0,05 xem là có ý nghĩa thống kê. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: mức độ nở của phôi nang*

Kết quả Bảng **3.13** cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm ở tất cả các thông số động học. Cụ thể: thời điểm tSC ở nhóm BL 3,4 là 72,00 giờ (62,00-83,00), muộn hơn đáng kể so với nhóm BL 5,6,7 (66,43 giờ; 60,04-75,44), với *p* = 0,002. Thời điểm tM cũng có xu hướng xảy ra muộn hơn ở nhóm BL 3,4 so với nhóm BL 5,6,7 (lần lượt là 85,40 giờ (78,35-92,15) vs. 82,32 giờ (77,23-88,06); *p* = 0,020). Thời điểm tSB ở nhóm phôi BL 3,4 xảy ra muộn hơn đáng kể lần lượt là (97,35 (93,50-105,05) giờ vs. 95,35 giờ (91,25-99,21); *p* = 0,003), cho thấy sự chậm

trễ trong việc chuẩn bị cho quá trình thoát màng. Thời điểm tBL2 và tB ở nhóm BL 3,4 cũng muộn hơn rõ rệt so có ý nghĩa thống kê với nhóm BL 5,6,7 (tBL2: 105,10 giờ (100,08-112,00) vs. 101,30 giờ (97,30-106,30), p = 0,001; tB: 108,05 giờ (103,15-115,48) vs. 105,00 giờ, (100,44-110,06), p = 0,001).

Trong những năm gần đây, tiềm năng ứng dụng của hệ thống tủ nuôi cấy kết hợp với chụp hình liên tục (time-lapse imaging) ngày càng được mở rộng, từ vai trò ban đầu là công cụ quan sát quá trình phát triển của phôi trở thành một phương tiện hỗ trợ đánh giá, lựa chọn và dự đoán tiềm năng phát triển phôi. Việc thu thập hình ảnh liên tục cho phép tối ưu hóa quá trình lựa chọn phôi dựa trên phân loại hình thái truyền thống, đồng thời cung cấp thêm các thông số động học mới phản ánh quá trình phát triển của phôi. Các thông số động học hình thái này được kỳ vọng có thể bổ sung thông tin có giá trị cho quá trình lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển cao nhất, qua đó góp phần cải thiện kết quả lâm sàng trong thụ tinh trong ống nghiệm.

Các kết quả của nghiên cứu của chúng tôi cho thấy phôi có chất lượng hình thái tốt hơn có xu hướng đạt được các mốc động học phát triển sớm hơn, phản ánh mối liên hệ chặt chẽ giữa động học phát triển sớm và chất lượng hình thái phôi nang. Cụ thể, các phôi có khối tế bào ICM và lớp tế bào TE chất lượng cao không chỉ hoàn thành các mốc động học quan trọng như tSC, tM, tSB, tBL2 và tB sớm hơn mà còn thể hiện sự đồng bộ cao hơn trong quá trình phân chia và biệt hóa. Bên cạnh đó, tốc độ đạt được các mốc động học chính cũng có liên quan chặt chẽ với mức độ nở của phôi nang, cho thấy các thông số động học nêu trên có thể phản ánh không chỉ chất lượng hình thái của ICM và TE mà còn mức độ phát triển tổng thể của phôi nang. Do đó các thông số động học phát triển sớm có thể được sử dụng như các chỉ số bổ trợ có giá trị trong đánh giá chất lượng phôi, góp phần nâng cao độ chính xác của quá trình lựa chọn phôi khi được kết hợp với phân loại hình thái truyền thống.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự đồng nhất với nhiều nghiên cứu trước đó. Nghiên cứu của Motato và cộng sự (2016) về giá trị tiên lượng của động học hình thái cho thấy thời điểm kết thúc quá trình nén (tM) (81,28-96,00 giờ) được xác định là thông số có giá trị dự đoán cao đối với khả năng hình thành phôi nang, phản ánh vai trò quan trọng của tốc độ và tính liên tục của quá trình phân chia sớm [68]. Jiang và cộng sự (2024) chỉ ra rằng các thông số động học liên quan đến giai đoạn phát triển trung gian và muộn của phôi, bao gồm thời điểm tSC, tM, tSB và tB, có mối liên quan chặt chẽ với chất lượng hình thái và tiềm năng phát triển của phôi nang. Cụ thể, các phôi phát triển thành phôi nang chất lượng cao có xu hướng đạt các mốc tSC, tM, tSB và tB sớm hơn so với các phôi nang chất lượng thấp. Đồng thời, các phôi lệch bội có sự phát triển chậm đáng kể tại các mốc động học này so với các

phôi chuẩn bội, cho thấy sự rối loạn trong tiến trình phân chia, phôi nén và tạo khoang. Đặc biệt sau khi hiệu chỉnh theo tuổi và chỉ số BMI thông qua phân tích hồi quy logistic, các thông số hình thái động học muộn, cụ thể là tM (OR 0,96; 95% CI 0,93-0,99), tSB (OR 0,94; 95% CI 0,90-0,97) và tB (OR 0,93; 95% CI 0,90-0,97), được xác định là các yếu tố độc lập ảnh hưởng đến sự hình thành phôi nang, phôi nang chất lượng cao. Những kết quả này nhấn mạnh rằng các thông số động học từ giai đoạn nén đến tạo khoang phản ánh chặt chẽ mức độ biệt hóa và phát triển hình thái của phôi nang, có giá trị bổ trợ quan trọng trong đánh giá và lựa chọn phôi [123].

Một nghiên cứu khác về động học hình thái với chất lượng phôi nang cũng cho thấy các thông số động học liên quan đến quá trình hình thành và phát triển phôi nang, bao gồm tSC, tM, tSB, tB, tBL2 và tEB có giá trị tiên lượng đáng kể đối với phôi nang chất lượng cao. Các phôi chất lượng cao có xu hướng hoàn thành các mốc động học trên sớm hơn các phôi chất lượng thấp, phản ánh khả năng tạo khoang và biệt hóa phôi thuận lợi. Trong số các chỉ số được phân tích, tB (AUC = 0,727, 95% CI 0,675-0,775) là thông số có giá trị dự báo cao và ổn định nhất đối với phôi nang chất lượng cao, không phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của phôi tại thời điểm đánh giá. Các thông số tM, tSB và tB cũng cho thấy ý nghĩa tiên lượng quan trọng [124].

Nghiên cứu về mối liên quan giữa các thông số động học về tình trạng nhiễm sắc thể của phôi còn cho thấy sau khi hiệu chỉnh các yếu tố liên quan đến bệnh nhân và chu kỳ điều trị, các thông số động học ở giai đoạn phân cắt muộn và phôi nang vẫn có ý nghĩa. Đặc biệt là tSB và tB, cho thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê với tình trạng nhiễm sắc thể của phôi. Trong mô hình hồi quy logistic đa mức, tSB và tB là các chỉ số độc lập có giá trị phân biệt giữa phôi chuẩn bội và phôi lệch bội, trong khi không ghi nhận ảnh hưởng có hệ thống của các yếu tố bệnh nhân hoặc chu kỳ lên các thông số động học này. Các phôi mang bất thường nhiễm sắc thể, bao gồm mất đoạn, lặp đoạn hoặc thể đơn nhiễm, đều ghi nhận sự kéo dài đáng kể tại các mốc tSB và tB. Điều này phản ánh sự chậm trễ trong quá trình tạo khoang và hình thành phôi nang. Đáng chú ý, các phôi có mất đoạn nhiễm sắc thể, đặc biệt liên quan đến nhiễm sắc thể 20 hoặc 22, cho thấy sự trì hoãn từ giai đoạn phân cắt đến phôi nang. Sự chậm trễ này cũng xuất hiện ở các mốc động học trung gian như thời gian bắt đầu nén và thời gian hoàn thành quá trình nén (tSC, tM). Kết quả này củng cố vai trò của các thông số động học từ quá trình nén đến phôi nang như những dấu hiệu sinh học phản ánh sự ổn định di truyền và tiềm năng phát triển của phôi [125]. Điều này cho thấy các sai lệch nhiễm sắc thể có thể ảnh hưởng đến động học phát triển. Do đó, việc tích hợp các thông số động học với đánh giá di truyền có thể góp phần nâng cao độ chính xác trong lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển và làm tổ tốt trong IVF.

3.4. Kết quả thai kỳ sau chuyển một phôi nang chu kỳ rã đông

3.4.1. Đặc điểm lâm sàng của chu kỳ chuyển phôi giữa hai nhóm kết quả thai

Bảng 3.14. Đặc điểm lâm sàng của chu kỳ chuyển phôi giữa hai nhóm

Đặc điểm	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
Tuổi mẹ (năm)	30,1 ± 4,2	30,9 ± 4,6	0,06[a]
Vô sinh nguyên phát Vô sinh thứ phát	198 (57,7%) 145 (42,3%)	93 (55,4%) 75 (44,6%)	0,694[c]
AMH	6,1 ± 4,2	5,8 ± 4,1	0,07[b]
AFC	31,6 ± 16,7	30,5 ± 16,9	0,07[b]
BMI	21,1 ± 2,5	20,9 ± 2,5	0,44[a]
Độ dày NMTC	9,5 ± 1,2	9,4 ± 1,4	0,456[a]
	Có thai diễn tiến	**Không có thai diễn tiến**	
Tuổi mẹ	29,7 ± 4,05	30,9 ± 4,5	0,052[a]
Vô sinh nguyên phát Vô sinh thứ phát	144 (56,7%) 110 (43,3%)	140 (54,5%) 117 (45,5%)	0,69[c]
AMH	6,0 ± 4,2	5,9 ± 4,1	0,055[b]
AFC	31,7 ± 16,7	30,4 ± 16,9	0,062[b]
BMI	21,1 ± 2,5	21,1 ± 2,5	0,953[a]
Độ dày NMTC	9,6 ± 1,2	9,4 ± 1,3	0,059[a]

Chú thích: Biến định lượng được mô tả bằng trung bình (mean ± SD), biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). Giá trị p dựa vào [a]Kiểm định t, [b]Kiểm định phi tham số Mann-Whitney U, [c]Kiểm định Chi-square. AMH: Anti-mullerian Hormone, hormone dự trữ buồng trứng. AFC: Antral Follicle Count, số nang thứ cấp. BMI: Body Mass Index, chỉ số khối cơ thể. NMTC: Niêm mạc tử cung

Kết quả Bảng **3.14** cho thấy các đặc điểm nền của bệnh nhân giữa nhóm có làm tổ và không làm tổ, cũng như giữa hai nhóm thai diễn tiến và thai không diễn tiến, nhìn chung khá tương đồng. Không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về loại vô sinh, chỉ số BMI và độ dày niêm mạc tử cung giữa các nhóm so sánh ($p > 0,05$), cho thấy quần thể nghiên cứu có tính đồng nhất tương đối về các yếu tố lâm sàng cơ bản. Tuổi mẹ có xu hướng thấp hơn ở nhóm có làm tổ và nhóm thai diễn tiến so với các nhóm đối chứng tương ứng, tuy nhiên sự khác biệt này chưa đạt ý nghĩa thống kê, với giá trị p gần ngưỡng 0,05. Tương tự, các chỉ số dự trữ buồng trứng như AMH và AFC có xu hướng cao hơn ở nhóm có kết cục thuận lợi, song cũng chỉ đạt mức ý nghĩa xu hướng mà chưa có ý nghĩa thống kê rõ ràng.

Tuổi mẹ là yếu tố đã được chứng minh có ảnh hưởng mạnh mẽ đến chất lượng noãn, tỷ lệ lệch bội của phôi và khả năng làm tổ [100]. Trong nghiên cứu này, tuổi mẹ trung bình ở nhóm có làm tổ và nhóm thai diễn tiến thấp hơn so với nhóm không

làm tổ và thai không diễn tiến. Mặc dù sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê, xu hướng này vẫn phù hợp với sinh lý sinh sản đã được ghi nhận trong y văn. Việc không quan sát thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê có thể liên quan đến độ tuổi trung bình của quần thể nghiên cứu tương đối trẻ, làm giảm tác động phân biệt của yếu tố tuổi.

Các chỉ số AMH và AFC đều có xu hướng cao hơn ở nhóm có kết cục thuận lợi, cả về làm tổ và thai diễn tiến. Mặc dù AMH và AFC không phản ánh trực tiếp chất lượng phôi, nhiều nghiên cứu cho thấy dự trữ buồng trứng tốt thường đi kèm với tỷ lệ tạo phôi nang và lựa chọn được phôi chất lượng cao hơn [126]. Nghiên cứu phân tích tổng hợp của Tal và cộng sự (2015) về giá trị tiên lượng của AMH với kết quả làm tổ và thai lâm sàng cho thấy chỉ số này có mối tương quan thấp. Ứng dụng trên lâm sàng của chỉ số AMH chủ yếu dành cho nhóm bệnh nhân giảm dự trữ buồng trứng (AMH < 1,2 ng/mL) [127]. Tương tự chỉ số AFC cũng là yếu tố tiên lượng đến đáp ứng kích thích buồng trứng và kết quả noãn - phôi thu được. AFC thấp tương quan với tỷ lệ hủy chu kỳ cao hơn, song chưa cho thấy có ảnh hưởng tới tỷ lệ làm tổ, kết quả có thai cũng như kết quả trẻ sinh sống [128]. Trong bối cảnh nghiên cứu tập trung vào chuyển đơn phôi nang, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê của AMH và AFC cho thấy các chỉ số này có vai trò hạn chế trong tiên lượng kết cục sau chuyển đơn phôi nang và chất lượng phôi được lựa chọn có thể đóng vai trò quan trọng hơn số lượng noãn hay dự trữ buồng trứng trong việc quyết định kết cục làm tổ.

Chỉ số BMI được ghi nhận là có thể ảnh hưởng đến kết cục IVF, với nhiều nghiên cứu cho thấy tình trạng thừa cân và béo phì liên quan đến giảm tỷ lệ có thai và trẻ sinh sống, cũng như tăng nguy cơ sảy thai [96]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ số BMI trung bình của các nhóm đều nằm trong khoảng bình thường và không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy ảnh hưởng của BMI lên kết cục làm tổ và thai kỳ có thể không rõ rệt trong quần thể có BMI thấp - trung bình. Độ dày niêm mạc tử cung cũng tương đồng giữa các nhóm, với giá trị trung bình đều nằm trong khoảng thuận lợi cho làm tổ, điều này cho thấy rằng yếu tố niêm mạc không phải là yếu tố gây nhiễu chính trong nghiên cứu này.

Việc các đặc điểm nền lâm sàng giữa các nhóm không có sự khác biệt đáng kể cho thấy quần thể nghiên cứu có tính đồng nhất cao. Do đó chúng tôi nhận thấy các yếu tố lâm sàng nền được xem là tương đối cân bằng giữa các nhóm, sự khác biệt về các đặc điểm lâm sàng ít ảnh hưởng gây nhiễu tới kết quả phân tích. Điều này củng cố giá trị của các phân tích tiếp theo, đặc biệt khi nghiên cứu tập trung vào vai trò tiên lượng độc lập của các chỉ số đã được lựa chọn trong nghiên cứu.

3.4.2. Mối liên quan giữa chất lượng hình thái phôi và kết quả thai

Bảng 3.15. Mối liên quan giữa phân độ phôi và kết quả làm tổ, thai diễn tiến

Phân độ phôi nang	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
Rất tốt (RT) Tốt (T) Trung bình (TB)	236 (68,8%) 93 (27,1%) 14 (4,1%)	57 (33,9%) 74 (44,1%) 37 (22%)	<0,001
	Có thai diễn tiến	**Không có thai diễn tiến**	
Rất tốt (RT) Tốt (T) Trung bình (TB)	191 (75,2%) 57 (22,4%) 6 (2,4%)	102 (39,7%) 110 (42,8%) 45 (17,5%)	<0,001

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). p được tính theo kiểm định Chi-square (χ^2 test). Không có ô nào có tần suất kỳ vọng < 5. Giá trị p < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê

Bảng **3.15** cho thấy phân độ phôi nang giữa nhóm làm tổ và không làm tổ có sự khác biệt rõ rệt và có ý nghĩa thống kê (p < 0,001). Ở nhóm phôi làm tổ, tỷ lệ phôi đạt mức độ phôi nang RT chiếm ưu thế với 68,8%, trong khi tỷ lệ phôi T và phôi TB lần lượt là 27,1% và 4,1%. Ngược lại, trong nhóm không làm tổ, tỷ lệ phôi nang RT giảm mạnh xuống 33,9%, trong khi phôi T và TB tăng lên tương ứng 44,1% và 22,0%.

Đối với kết cục thai diễn tiến, tỷ lệ phôi có phân độ RT chiếm ưu thế trong nhóm thai diễn tiến (75,2%), cao hơn rõ rệt so với nhóm không thai diễn tiến (39,7%) (p < 0,001). Trong khi đó, tỷ lệ phôi T và TB ở nhóm không thai diễn tiến lần lượt là 42,8% và 17,5%, cao hơn đáng kể so với nhóm thai diễn tiến (22,4% và 2,4%).

Bảng 3.16. Mối liên quan giữa hình thái ICM và kết quả làm tổ, thai diễn tiến

Điểm ICM	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
ICM A ICM B ICM C	271 (79%) 58 (16,9%) 14 (4,1%)	81 (48,2%) 55 (32,7%) 32 (19,0%)	<0,001
Điểm ICM	**Có thai diễn tiến**	**Không có thai diễn tiến**	**Giá trị p**
ICM A ICM B ICM C	213 (83,9%) 35 (13,8%) 6 (2,4%)	139 (54,1%) 78 (30,4%) 40 (15,6%)	<0,001

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). p được tính theo kiểm định Chi-square (χ^2 test). Không có ô nào có tần suất kỳ vọng < 5. Giá trị p < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi

Xét về đặc điểm hình thái ICM, giữa hai nhóm có sự khác biệt rõ rệt và được trình bày trong Bảng **3.16**. Tỷ lệ phôi có ICM A chiếm ưu thế ở cả hai nhóm, tuy nhiên nhóm phôi làm tổ có tỷ lệ ICM A cao hơn đáng kể (79,0%) so với nhóm không làm tổ (48,2%; p < 0,001). Ngược lại, tỷ lệ ICM B và C ở nhóm không làm tổ cao hơn lần lượt 32,7% và 19,0%, so với 16,9% và 4,1% ở nhóm có làm tổ.

Khi xét theo kết cục thai diễn tiến, xu hướng tương tự cũng được ghi nhận. Phôi có thai diễn tiến có tỷ lệ ICM loại A cao hơn đáng kể (83,9%) so với nhóm không có thai diễn tiến (54,1%; p < 0,001), trong khi tỷ lệ ICM B và C ở nhóm không có thai diễn tiến tăng lên tương ứng 30,4% và 15,6%.

Bảng 3.17. Mối liên quan giữa hình thái TE và kết quả làm tổ, thai diễn tiến

Điểm TE	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
TE A	248 (72,3%)	64 (38,1%)	<0,001
TE B	86 (25,1%)	71 (42,3%)	
TE C	9 (2,6%)	33 (19,6%)	
Điểm TE	**Có thai diễn tiến**	**Không có thai diễn tiến**	
TE A	199 (78,3%)	113 (44,0%)	<0,001
TE B	52 (20,5%)	105 (40,9%)	
TE C	3 (1,2%)	39 (15,1%)	

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). p được tính theo kiểm định Chi-square (χ^2 test). Không có ô nào có tần suất kỳ vọng < 5. Giá trị p < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi

Bảng **3.17** cho thấy chất lượng lớp tế bào lá nuôi TE, giữa hai nhóm có sự khác biệt rõ rệt. Tỷ lệ phôi có lớp tế bào lá nuôi TE A chiếm ưu thế ở nhóm có làm tổ (72,3%) so với nhóm không làm tổ (38,1%, p < 0,001). Ngược lại, tỷ lệ phôi có lớp tế bào TE B và C ở nhóm không làm tổ cao hơn, lần lượt là 42,3% và 19,6%, trong khi ở nhóm làm tổ là 25,1% và 2,6%. Tương tự, khi xét theo kết cục thai diễn tiến, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê vẫn được ghi nhận (p < 0,001).

Bảng 3.18. Mối liên quan giữa hình thái độ nở và kết quả làm tổ, thai diễn tiến

Độ nở	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
BL3	12 (3,5%)	8 (4,8%)	0,588
BL4	35 (10,2%)	18 (10,7%)	
BL5	167 (48,7%)	76 (45,2%)	
BL6	110 (32,1%)	51 (30,4%)	
BL7	19 (5,5%)	15 (8,9%)	
	Có thai diễn tiến	**Không có thai diễn tiến**	
BL3	8 (3,1%)	12 (4,7%)	0,669
BL4	26 (10,2%)	27 (10,5%)	
BL5	121 (47,6%)	122 (47,5%)	
BL6	85 (33,5%)	76 (29,6%)	
BL7	14 (5,5%)	20 (7,8%)	

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). p kiểm định Chi-square. Không có ô nào có tần suất kỳ vọng < 5. p < 0,05 là có ý nghĩa thống kê. BL: độ nở phôi

Xét về độ nở của phôi nang, giữa nhóm có làm tổ và không làm tổ, nhóm có thai diễn tiến và không có thai diễn tiến không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p = 0,588, p = 0,669), được thể hiện trong Bảng **3.18**. Phôi độ nở BL5 - BL6 vẫn chiếm tỷ lệ chủ đạo trong các nhóm, chiếm khoảng trên 70% tổng số phôi chuyển trong mỗi nhóm, phản ánh đặc điểm chung của toàn bộ mẫu nghiên cứu của chúng tôi.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hình thái phôi nang, bao gồm phân độ phôi nang, chất lượng ICM và TE, có mối liên quan chặt chẽ và có ý nghĩa thống kê với cả khả năng làm tổ và kết cục thai diễn tiến. Ngược lại, mức độ nở phôi nang tại thời điểm chuyển phôi không cho thấy giá trị tiên lượng đáng kể đối với các kết cục này.

Phân độ phôi nang tổng thể phản ánh mức độ phát triển và tổ chức cấu trúc của phôi nang tại thời điểm đánh giá. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ phôi nang đạt phân độ cao (RT) chiếm ưu thế rõ rệt ở nhóm có làm tổ và nhóm thai diễn tiến, trong khi các phôi có phân độ thấp hơn (T và TB) tập trung nhiều hơn ở nhóm không làm tổ và không thai diễn tiến. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê cao (p < 0,001) (Bảng **3.15)**, cho thấy phân độ phôi nang là một chỉ dấu hình thái quan trọng trong tiên lượng khả năng làm tổ và duy trì thai. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó phân độ phôi nang được xem là yếu tố tiên lượng mạnh đối với kết cục của một chu kỳ điều trị IVF, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi nang [2,34,129].

Khi phân tích sâu hơn từng thành phần cấu trúc của phôi nang, chất lượng ICM cho thấy mối liên quan đặc biệt rõ rệt với cả khả năng làm tổ và thai diễn tiến. Nhóm phôi có ICM loại A chiếm tỷ lệ vượt trội ở nhóm có kết cục thuận lợi, trong khi tỷ lệ ICM loại B và C tăng đáng kể ở nhóm không làm tổ và không thai diễn tiến (Bảng **3.16**). ICM là tiền thân của thai nhi, do đó chất lượng ICM phản ánh trực tiếp tiềm năng phát triển phôi sau làm tổ. Các nghiên cứu giải phẫu bệnh học và di truyền học đã chỉ ra rằng phôi có ICM kém thường đi kèm với tỷ lệ lệch bội cao hơn và nguy cơ ngừng phát triển sớm [130,131]. Kết quả của nghiên cứu này củng cố vai trò trung tâm của ICM trong việc quyết định khả năng làm tổ và khả năng duy trì thai tiến triển.

Bên cạnh ICM, hình thái TE cũng cho thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê mạnh mẽ với kết cục lâm sàng. Phôi có TE loại A chiếm ưu thế rõ rệt ở nhóm làm tổ và nhóm thai diễn tiến, trong khi TE loại B và C phổ biến hơn ở nhóm kết cục bất lợi (Bảng **3.17**). TE đóng vai trò thiết yếu trong quá trình xâm nhập nội mạc tử cung, hình thành nhau thai và điều hòa tương tác mẹ và phôi trong giai đoạn sớm của thai kỳ. Do đó, chất lượng TE được xem là yếu tố quyết định trực tiếp đến khả năng làm tổ và sự ổn định của thai sớm [132,133]. Những phát hiện trong nghiên cứu này phù hợp với nhiều báo cáo trước đó, cho thấy TE có giá trị tiên lượng không kém, thậm

chí trong một số nghiên cứu còn vượt trội hơn ICM đối với khả năng làm tổ [134].

Ngược lại, độ nở tại thời điểm chuyển phôi không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm so sánh, cả đối với khả năng làm tổ và kết cục thai diễn tiến. Phần lớn phôi được chuyển trong nghiên cứu này nằm ở các mức BL5 và BL6, phản ánh chiến lược lựa chọn phôi nang đã đạt độ nở thuận lợi trước chuyển. Điều này có thể làm giảm khả năng phân biệt giá trị tiên lượng của độ nở phôi. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho thấy khi phôi đã đạt đến giai đoạn phôi nang hoàn chỉnh, phôi nang có độ nở từ BL3 trở lên được coi là độ nở ở giai đoạn phôi rất tốt [135,34,129], vai trò tiên lượng của độ nở trở nên hạn chế so với chất lượng ICM và TE [136]. Trong nghiên cứu của chúng tôi độ nở phôi từ độ nở BL3 trở lên được xem là đạt ngưỡng phát triển thuận lợi, thuộc đánh giá là độ nở thuận lợi về sự phát triển của phôi, giải thích cho việc không có sự khác biệt về độ nở của phôi trong nghiên cứu.

Tổng hợp các kết quả trên cho thấy hình thái phôi nang, đặc biệt là chất lượng ICM và TE, có giá trị tiên lượng quan trọng đối với kết quả thai. Việc không ghi nhận mối liên quan có ý nghĩa giữa độ nở phôi và kết cục lâm sàng nhấn mạnh rằng đánh giá hình thái phôi nang nên được tiếp cận một cách toàn diện, trong đó tập trung vào chất lượng các cấu trúc tế bào hơn là chỉ dựa trên mức độ nở. Những phát hiện này cung cấp cơ sở khoa học vững chắc cho việc ưu tiên lựa chọn phôi nang có ICM và TE chất lượng cao trong chiến lược chuyển đơn phôi nhằm tối ưu hóa kết cục thai kỳ.

3.4.3. Mối liên quan giữa EEVA và kết quả thai

Bảng 3.19. Mối liên quan giữa điểm EEVA và kết quả làm tổ, thai diễn tiến

Điểm EEVA	Có làm tổ	Không làm tổ	Giá trị p
E1	169 (49,3%)	51 (30,4%)	<0,001
E2	97 (28,3%)	37 (22%)	
E3	40 (11,7%)	36 (21,4%)	
E4	24 (7,0%)	28 (16,7%)	
E5	13 (3,8%)	16 (9,5%)	
Điểm EEVA	**Có thai diễn tiến**	**Không có thai diễn tiến**	**Giá trị p**
E1	135 (53,1%)	85 (33,1%)	<0,001
E2	73 (28,7%)	61 (23,7%)	
E3	25 (9,8%)	51 (19,8%)	
E4	14 (5,5%)	38 (14,8%)	
E5	7 (2,8%)	22 (8,6%)	

Chú thích: Biến định tính được mô tả bằng tần suất và tỷ lệ (%). p được tính theo kiểm định Chi-square (χ^2 test). Giá trị p < 0,05 được xem là có ý nghĩa thống kê. E: điểm EEVA, Early embryo viability assessment - Đánh giá khả năng sống của phôi giai đoạn sớm

Xét về điểm EEVA, giữa nhóm làm tổ và không làm tổ có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, được trình bày trong Bảng **3.19**. Tỷ lệ phôi có điểm EEVA ở ngày 3 là E1 cao hơn rõ rệt ở nhóm có làm tổ (49,3%) so với nhóm không làm tổ (30,4%, p < 0,001). Ngược lại, ở nhóm không làm tổ, tỷ lệ phôi thuộc nhóm EEVA cao (E3, E4, E5) cao hơn rõ rệt, (47,6%) so với nhóm làm tổ (22,5%).

Phân tích kết cục thai diễn tiến cũng cho kết quả tương tự. Nhóm có thai diễn tiến có tỷ lệ phôi E1 (53,1%) cao hơn so với nhóm không có thai diễn tiến (33,1%) (p < 0,001), trong khi nhóm không thai diễn tiến có tỷ lệ phôi thuộc nhóm EEVA cao (E3, E4, E5) (43,2%) cao hơn so với nhóm thai diễn tiến (18,1%) (p < 0,001).

Kết quả nghiên cứu cho thấy điểm EEVA có mối liên quan chặt chẽ và có ý nghĩa thống kê với cả kết cục làm tổ và thai diễn tiến. Sự khác biệt rõ rệt trong phân bố điểm EEVA giữa các nhóm so sánh (p < 0,001) cho thấy giá trị tiên lượng của hệ thống EEVA trong đánh giá tiềm năng phát triển và khả năng làm tổ của phôi.

Kết quả của nghiên cứu phù hợp với cơ sở sinh học của hệ thống EEVA, dựa trên phân tích các thông số động học phân chia sớm của phôi, bao gồm thời gian phân chia và số lượng phôi bào. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự sai lệch trong các mốc phân chia sớm liên quan đến bất thường nhiễm sắc thể, rối loạn điều hòa chu kỳ tế bào và giảm khả năng phát triển đến phôi nang chất lượng tốt. Do đó, điểm EEVA cao (E3-E5) có thể phản ánh những rối loạn tiềm ẩn trong quá trình phát triển của phôi, dẫn đến giảm khả năng làm tổ và thai diễn tiến [10,137].

Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với các báo cáo trước đây về hiệu quả của EEVA trong tiên lượng kết cục lâm sàng. Conaghan và cộng sự cho thấy việc kết hợp hệ thống EEVA với đánh giá hình thái ngày 3 giúp cải thiện đáng kể khả năng lựa chọn phôi có tiềm năng làm tổ cao hơn so với đánh giá hình thái đơn thuần [44]. VerMilyea và cộng sự cũng cho thấy EEVA có mối liên quan chặt chẽ tới khả năng làm tổ và thai diễn tiến. Phôi có điểm EEVA là E1 cho tỷ lệ làm tổ và thai diễn tiến cao hơn so với phôi có điểm EEVA cao hơn là E3, E4, E5 [42]. Meseguer và cộng sự cũng ghi nhận rằng các thuật toán dựa trên động học hình thái có thể dự đoán khả năng làm tổ một cách độc lập, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi [10]. Một số nghiên cứu khác cho rằng giá trị của EEVA thể hiện rõ nhất trong việc phân tầng phôi, hỗ trợ quyết định lâm sàng khi có nhiều phôi tương đương về hình thái [138].

Mặc dù EEVA được sử dụng để đánh giá phôi ở giai đoạn phân chia sớm (ngày 2-3) và không trực tiếp phản ánh các đặc điểm hình thái của phôi nang như ICM và TE nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy EEVA có giá trị tiên lượng tới chất lượng và hình thái phôi nang. Điều này cho thấy rằng các đặc điểm động học

sớm có thể phản ánh phần nào tiềm năng phát triển ở giai đoạn muộn hơn của phôi.

Do đó, trong bối cảnh nuôi cấy phôi dài ngày và chuyển phôi nang, EEVA có thể được xem là một công cụ hỗ trợ bổ sung, giúp chọn phôi sớm cho các phương pháp đánh giá phôi nang truyền thống. Việc kết hợp EEVA với các thông số động học và hình thái phôi nang có thể mang lại giá trị tiên lượng toàn diện hơn đối với kết cục thai kỳ.

3.4.4. Mối liên quan giữa các thông số động học và kết quả thai

Chúng tôi đã phân tích mối tương quan giữa các thông số động học hình thái phôi nang và tỷ lệ làm tổ, giữa các thông số động học hình thái phôi nang và tỷ lệ thai diễn tiến Bảng **3.20**.

Bảng 3.20. Các thông số động học hình thái của phôi làm tổ và phôi không làm tổ; của phôi thai kỳ diễn tiến và phôi thai kỳ không diễn tiến

Thông số	**Có làm tổ (n=343)**		**Không làm tổ (n=168)**		**Giá trị p**
	Trung vị	**Q1-Q3**	**Trung vị**	**Q1-Q3**	
tSC	67,00	60,00-75,10	68,88	60,55-79,39	**0,040**
tM	82,35	72,25-88,00	84,00	77,59-102,35	0,062
tSB	95,15	91,00-95,15	97,12	93,19-102,35	<**0,001**
tBL2	101,35	97,30-106,00	103,08	98,48-109,21	**0,003**
tB	105,00	100,30-110,05	106,3	102,11-113,08	**0,006**
Thông số	**Có thai diễn tiến**		**Không có thai diễn tiến**		
tSC	66,50	59,49-74,32	68,55	61,03-78,10	**0,023**
tM	82,00	76,23-87,39	83,35	78,28-90,53	**0,008**
tSB	95,05	90,25-98,43	96,40	93,00-101,30	**<0,001**
tBL2	101,05	96,89-106	102,45	98,45-108,30	**0,005**
tB	104,38	100,24-110,21	106,25	102,00-112,28	**0,001**

Chú thích: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung vị (median) khoảng tứ phân vị (interquartile range: IQR, Q1-Q3). Kiểm định Mann-Whitney U với hiệu chỉnh Bonferroni được sử dụng do dữ liệu không phân phối chuẩn, để so sánh sự khác biệt giữa nhóm làm tổ và không làm tổ, thai diễn tiến và không diễn tiến. p *< 0,05 xem là có ý nghĩa thống kê. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi*

Kết quả trong Bảng **3.20** chỉ ra rằng, so sánh trung vị giữa các phôi có làm tổ

(n = 343) và không làm tổ (n = 168) cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nhiều thông số động học. Trung vị của tSC (thời điểm bắt đầu nén) ở nhóm làm tổ thấp hơn so với nhóm không làm tổ 67,00 giờ (60,00-75,10) so với 68,88 giờ (60,55-79,39); p = 0,040. Tương tự, trung vị của các thông số ở nhóm làm tổ khi so sánh với nhóm không làm tổ như tSB (bắt đầu tạo khoang) 95,15 giờ (91,00-95,15) vs 97,12 giờ (93,19-102,35); p < 0,001), tBL2 (khoang phôi nang chiếm hơn 1 nửa thể tích phôi) 101,35 giờ (97,30-106,00) vs 103,08 giờ (98,48-109,21); p = 0,003), và tB (khoang chiếm toàn bộ thể tích phôi) 105,00 giờ (100,30-110,05) vs 106,3 giờ (102,11-113,08); p = 0,006), đều thấp hơn và có ý nghĩa thống kê. Riêng thông số tM (phôi hoàn thành quá trình nén) có xu hướng sớm hơn ở nhóm làm tổ (82,35 giờ (72,25-88,00) so với 84,00 giờ (77,59-102,35)), không có ý nghĩa thống kê (p = 0,062).

Trong số các phôi đã làm tổ, nhóm dẫn đến thai diễn tiến cũng có đặc điểm động học thuận lợi hơn so với nhóm thai không diễn tiến. Cụ thể, trung vị của tSC, tM, tSB, tBL2 và tB đều thấp hơn ở nhóm thai diễn tiến, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các giá trị p lần lượt là 0,023; 0,008; <0,001; 0,005 và 0,001.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các phôi đạt kết cục lâm sàng thuận lợi (có làm tổ và có thai diễn tiến) có xu hướng hoàn thành các mốc động học hình thái quan trọng sớm hơn so với các phôi không đạt kết cục. Phôi có khả năng làm tổ và thai diễn tiến bắt đầu quá trình nén sớm hơn, đặc biệt rõ rệt ở các mốc sau giai đoạn phôi nén. Trong số các thông số được phân tích, tSB, tBL2 và tB thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nhất quán giữa các nhóm so sánh (p < 0,01), cho thấy các mốc động học này có thể đóng vai trò tiên lượng khả năng làm tổ và thai diễn tiến, đồng thời hỗ trợ lựa chọn phôi có tiềm năng phát triển tốt hơn.

Cụ thể, tSB - thời điểm bắt đầu hình thành khoang phôi, là chỉ số cho thấy mối liên quan mạnh mẽ với cả hai kết cục lâm sàng. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy các phôi có tSB sớm hơn có tỷ lệ làm tổ và thai diễn tiến cao hơn, do phản ánh khả năng tái cấu trúc tế bào và biệt hóa sớm của phôi nang [10,68]. Soukhov và cộng sự (2022) cũng chỉ ra rằng tỷ lệ phôi làm tổ thành công, được xác định qua phân tích hồi cứu, cao hơn đáng kể (58,8% so với 42,6%, p = 0,02) đối với phôi có khoảng thời gian ngắn đến tSB (78 - 95,9 giờ) so với phôi có khoảng thời gian dài hơn (96 - 114 giờ), có nghĩa là mức động học tSB xảy ra sớm hơn [139].

Tương tự, tBL2 và tB, đại diện cho các giai đoạn phát triển sau giai đoạn tạo khoang của phôi, cũng được ghi nhận là các chỉ số tiên lượng quan trọng, đặc biệt trong bối cảnh chuyển đơn phôi nang [140]. Tuy nhiên, nghiên cứu của Desai và cộng sự (2014) không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các thông số động học

tM, tSB và tB giữa nhóm phôi làm tổ và không làm tổ [141]. Kết quả này cho thấy rằng giá trị tiên lượng của các thông số động học này có thể chịu ảnh hưởng hoặc bị điều biến bởi các yếu tố khác liên quan đến bệnh nhân, chu kỳ điều trị hoặc điều kiện phòng Lab của mỗi trung tâm.

Đối với các mốc sớm hơn như tSC và tM cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, tuy nhiên mức độ khác biệt không lớn. Điều này cho thấy thời điểm bắt đầu nén có thể phản ánh một phần chất lượng phôi, nhưng giá trị tiên lượng độc lập đối với kết cục lâm sàng còn hạn chế so với các mốc liên quan đến hình thành khoang phôi. Dấu hiệu tiên lượng của khả năng hình thành phôi nang và kết cục lâm sàng có thể không giống nhau [141].

Nhìn chung, kết quả của nghiên cứu này phù hợp với xu hướng chung trong y văn, theo đó các chỉ số động học phát triển sớm có thể là dấu hiệu cho sự hình thành phôi nang nhưng các chỉ số động học sau nén, đặc biệt là tSB và tB, có giá trị tiên lượng lâm sàng cao hơn so với các mốc phát triển sớm. Vì vậy, việc tích hợp các thông số động học này vào chiến lược lựa chọn phôi có thể góp phần nâng cao hiệu quả chuyển đơn phôi nang và tối ưu hóa kết cục thai kỳ.

3.4.5. Giá trị tiên lượng của đánh giá hình thái, phần mềm EEVA, động học với kết quả làm tổ

Để đánh giá giá trị tiên lượng độc lập của từng thông số đối với kết quả làm tổ, các biến số được phân tích riêng lẻ nhằm xác định mức độ liên quan với khả năng làm tổ của phôi. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic đơn biến, sử dụng phương pháp GEE (Generalized Estimating Equations) nhằm hiệu chỉnh sự tương quan nội tại giữa các phôi thuộc cùng một bệnh nhân. Cách tiếp cận này cho phép ước lượng chính xác hơn ảnh hưởng của từng thông số lên kết cục làm tổ, đồng thời đảm bảo tính tin cậy của các kết quả thống kê [88]. Ngoài ra, phân tích đơn biến còn giúp nhận diện những biến không có bất kỳ mối liên quan nào với kết cục, từ đó hỗ trợ quá trình xây dựng mô hình một cách hợp lý và tránh đưa quá nhiều biến không cần thiết vào mô hình, đặc biệt khi cỡ mẫu hoặc số lượng biến lớn. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi, việc lựa chọn biến cho mô hình đa biến không chỉ dựa trên giá trị *p* của phân tích đơn biến. Thay vào đó, chúng tôi sẽ kết hợp kết quả phân tích thống kê với cơ sở lý thuyết, bằng chứng từ y văn và ý nghĩa lâm sàng của từng biến.

Ngoài ra, việc sử dụng mô hình GEE giúp hạn chế sai số do hiện tượng phụ thuộc dữ liệu, đặc biệt trong bối cảnh mỗi bệnh nhân có thể đóng góp nhiều phôi vào phân tích. Các kết quả từ mô hình đơn biến là cơ sở quan trọng để lựa chọn các biến có ý nghĩa thống kê đưa vào mô hình đa biến ở các bước phân tích tiếp theo. Việc

này giúp đánh giá vai trò tiên lượng độc lập sau khi đã hiệu chỉnh các yếu tố gây nhiễu, nhằm xây dựng mô hình tiên lượng toàn diện có độ tin cậy cao và có giá trị ứng dụng lâm sàng cao hơn [88,89].

Bảng 3.21. Phân tích đơn biến các yếu tố liên quan đến khả năng làm tổ

		Phân tích đơn biến		
Đặc điểm		**OR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Tuổi mẹ (năm)		-		0,069
Độ dày niêm mạc tử cung		-		0,455
BMI		-		0,437
Tuổi phôi (ngày 6 với ngày 5)		0,393	0,219-0,705	**0,002**
Độ nở phôi nang	BL4 vs BL3	-		0,631
	BL5 vs BL3	-		0,423
	BL6 vs BL3	-		0,456
	BL7 vs BL3	-		0,768
Điểm ICM	ICM B vs ICM A	0,315	0,202-0,492	< **0,001**
	ICM C vs ICM A	0,131	0,067-0,257	< **0,001**
Điểm TE	TE B vs TE A	0,313	0,206-0,475	< **0,001**
	TE C vs TE A	0,070	0,032-0,155	< **0,001**
Điểm EEVA	E2 vs E1	0,791	0,484-1,293	0,350
	E3 vs E1	0,335	0,194-0,580	< **0,001**
	E4 vs E1	0,259	0,138-0,485	< **0,001**
	E5 vs E1	0,245	0,111-0,544	**0,001**
Động học	tSC	0,977	0,961-0,994	**0,008**
	tM	0,976	0,957-0,996	**0,019**
	tSB	0,966	0,936-0,989	**0,036**
	tBL2	0,957	0,935-0,980	**<0,001**
	tB	0,955	0,935-0,989	**0,034**

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp Generalized Estimating Equations (GEE). tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi nang. ICM: inner cell mass-tế bào nội phôi. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi. BL: độ nở phôi nang. BMI: body mass index-chỉ số cơ thể

Kết quả phân tích đơn biến bằng mô hình GEE cho thấy một số yếu tố có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với khả năng làm tổ của phôi nang, Bảng **3.21**.

Trong các đặc điểm lâm sàng, tuổi mẹ, BMI và độ dày niêm mạc tử cung (NMTC) không có mối liên quan đáng kể với tỷ lệ làm tổ ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tuổi phôi có ảnh hưởng rõ rệt, khi phôi nang ngày 6 có khả năng làm tổ thấp hơn đáng kể so với phôi nang ngày 5 (OR = 0,393; 95% CI: 0,219-0,705; $p = 0,002$). Xét về đặc điểm hình thái, điểm ICM và điểm TE đều cho thấy mối liên quan mạnh với khả năng

làm tổ. Cụ thể, so với ICM loại A, các phôi có ICM loại B và C có khả năng làm tổ thấp hơn đáng kể (OR lần lượt là 0,315 và 0,131; $p < 0,001$). Phôi có TE B và C cũng có khả năng làm tổ thấp hơn so với TE A (OR lần lượt là 0,313 và 0,070; $p < 0,001$).

Đối với điểm EEVA, so với nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 thấp nhất (E1), các nhóm phôi có điểm EEVA ngày 3 cao hơn là E3, E4 và E5 có khả năng làm tổ thấp hơn có ý nghĩa thống kê, với OR lần lượt là 0,335; 0,259 và 0,245 ($p < 0,001$).

Trong các thông số động học, thời điểm xảy ra các mốc động học tSC, tM, tSB, tBL2 và tB đều có mối liên quan nghịch với khả năng làm tổ, tức là phôi có các mốc phát triển sớm hơn thường có khả năng làm tổ cao hơn. Cụ thể, tSC (OR = 0,977; $p = 0,008$), tM (OR = 0,976; $p = 0,019$), tSB (OR = 0,966; $p = 0,036$), tBL2 (OR = 0,957; $p < 0,001$) và tB (OR = 0,955; $p = 0,034$) đều có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.22. Phân tích đơn biến các yếu tố liên quan đến kết quả thai diễn tiến

Thai diễn tiến				
Đặc điểm		**OR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Tuổi mẹ (năm)		-		0,052
Độ dày niêm mạc tử cung		-		0,059
BMI		-		0,953
Tuổi phôi (ngày 6 với ngày 5)		0,385	0,205-0,723	**0,003**
Độ nở phôi nang	BL4 vs BL3	-		0,490
	BL5 vs BL3	-		0,402
	BL6 vs BL3	-		0,284
	BL7 vs BL3	-		0,932
Điểm ICM	ICM B vs ICM A	0,293	0,186-0,460	< **0,001**
	ICM C vs ICM A	0,098	0,040-0,237	< **0,001**
Điểm TE	TE B vs TE A	0,281	0,188-0,421	< **0,001**
	TE C vs TE A	0,044	0,013-0,145	< **0,001**
Điểm EEVA	E2 vs E1	0,753	0,488-1,164	0,202
	E3 vs E1	0,309	0,178-0,535	< **0,001**
	E4 vs E1	0,232	0,119-0,453	< **0,001**
	E5 vs E1	0,200	0,082-0,489	< **0,001**
Động học	tSC	0,978	0,962-0,994	**0,008**
	tM	0,972	0,953-0,991	**0,004**
	tSB	0,969	0,966-0,991	**0,007**
	tBL2	0,958	0,936-0,980	**<0,001**
	tB	0,966	0,956-0,989	**0,020**

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy 95%; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp Generalized Estimating Equations (GEE). BMI: chỉ số cơ thể. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi. ICM: inner cell mass-tế bào nội phôi. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi. BL: độ nở phôi nang. E: điểm EEVA

Phân tích đơn biến cho thấy một số yếu tố có mối liên quan có ý nghĩa thống kê với khả năng đạt thai diễn tiến sau chuyển phôi nang (Bảng **3.22**).

Trong nhóm đặc điểm lâm sàng, tuổi mẹ có xu hướng ảnh hưởng đến kết quả thai diễn tiến, tuy nhiên mối liên quan chưa đạt ý nghĩa thống kê (p = 0,052). Độ dày NMTC và BMI không cho thấy sự khác biệt đáng kể (p > 0,05). Tuổi phôi có ảnh hưởng rõ rệt, khi phôi nang ngày 6 có khả năng hình thành thai diễn tiến thấp hơn đáng kể so với phôi ngày 5 (OR = 0,385; 95% CI: 0,205-0,723; p = 0,003).

Xét về đặc điểm hình thái, cả điểm ICM và điểm TE đều cho thấy mối liên quan chặt chẽ với khả năng thai diễn tiến. So với ICM loại A, phôi có ICM loại B và C có khả năng hình thành thai diễn tiến thấp hơn rõ rệt (OR = 0,293 và 0,098; p < 0,001). Tương tự, phôi có TE loại B và C cũng có khả năng thai diễn tiến thấp hơn so với TE loại A (OR = 0,281 và 0,044; p < 0,001).

Điểm EEVA cho thấy mối liên quan nghịch với kết quả thai diễn tiến. So với phôi có điểm EEVA tốt (E1), các phôi ở nhóm E3, E4 và E5 có khả năng hình thành thai diễn tiến thấp hơn đáng kể (OR lần lượt là 0,309; 0,232 và 0,200; p < 0,001).

Đối với các thông số động học, thời điểm phân chia sớm hơn có xu hướng liên quan đến khả năng thai diễn tiến cao hơn. Cụ thể, các mốc thời gian tSC, tM, tSB, tBL2 và tB đều có mối liên quan nghịch với khả năng hình thành thai diễn tiến, với OR lần lượt là 0,978 (p = 0,008), 0,972 (p = 0,004), 0,969 (p = 0,007), 0,958 (p < 0,001) và 0,966 (p = 0,020).

Bảng 3.23. Kiểm tra đa cộng tuyến giữa các biến động học của phôi nang

Biến động học	Tolerance	VIF
tSC	0,407	2,455
tM	0,324	3,086
tSB	0,948	1,055
tB	0,962	1,039
tBL2	0,532	1,879

Chú thích: Hồi quy tuyến tính được thực hiện để kiểm tra hiện tượng đa cộng tuyến giữa các biến động học của phôi nang thông qua các chỉ số Tolerance và VIF. Tolerance: hệ số dung sai, phản ánh phần biến thiên độc lập của từng biến trong mô hình. VIF (Variance Inflation Factor): hệ số phóng đại phương sai, phản ánh mức độ tương quan tuyến tính giữa các biến độc lập. Tolerance < 0,2 hoặc VIF > 5 được coi là có đa cộng tuyến đáng kể. Trong nghiên cứu này, các biến đều có Tolerance > 0,2 và VIF < 5, mô hình không có đa cộng tuyến giữa các thông số động học. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi nang. ICM: inner cell mass-tế bào nội phôi. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi. BL: độ nở phôi nang

Kết quả kiểm tra hiện tượng đa cộng tuyến giữa các biến động học cho thấy các giá trị Tolerance dao động từ 0,324 đến 0,962 và hệ số VIF nằm trong khoảng từ 1,039 đến 3,086. Theo ngưỡng đánh giá thông thường (Tolerance < 0,2 hoặc VIF > 5 cho thấy có đa cộng tuyến đáng kể), không có biến độc lập nào vi phạm giả định về đa cộng tuyến (Bảng **3.23**). Điều này chứng tỏ các thông số động học được đưa vào mô hình, bao gồm tSC, tM, tSB, tBL2 và tB, có mức độ độc lập tương đối cao và không có hiện tượng tương quan tuyến tính mạnh giữa các biến. Do đó, các biến động học này đủ điều kiện để được đưa vào phân tích hồi quy đa biến nhằm đánh giá mối liên quan giữa đặc điểm động học của phôi và kết quả làm tổ.

Trong nghiên cứu này, kiểm định Chi-square được sử dụng trước hết nhằm so sánh tỷ lệ xuất hiện kết cục giữa các nhóm và đánh giá mối liên quan thô giữa từng biến độc lập và kết cục nghiên cứu. Phân tích này có vai trò quan trọng trong việc mô tả dữ liệu và phát hiện các khác biệt ban đầu, đồng thời cung cấp cái nhìn tổng quan về xu hướng phân bố kết cục theo từng nhóm giá trị của biến nghiên cứu. Tuy nhiên, Chi-square chỉ phản ánh sự khác biệt tỷ lệ sau khi phân nhóm biến và không cho phép định lượng mức độ ảnh hưởng của biến lên kết cục [142].

Do đó, hồi quy logistic đơn biến được tiếp tục thực hiện nhằm khắc phục những hạn chế của phép kiểm Chi-square. Hồi quy logistic cho phép ước tính tỉ số chênh (OR) và khoảng tin cậy 95% (CI), từ đó định lượng mức độ thay đổi xác suất xảy ra kết cục theo từng biến tiên lượng. Đồng thời, phương pháp này cho phép phân tích các biến dưới dạng liên tục, giúp bảo toàn tối đa thông tin của dữ liệu và tăng độ nhạy trong việc phát hiện mối liên quan, đặc biệt đối với các thông số động học phôi có tác động nhỏ nhưng nhất quán [143].

Bên cạnh đó, hồi quy logistic đơn biến đóng vai trò là bước sàng lọc cần thiết trước khi xây dựng mô hình hồi quy đa biến. Việc kết hợp kết quả từ phân tích Chi-square và hồi quy logistic đơn biến giúp lựa chọn các biến có ý nghĩa thống kê hoặc có giá trị sinh học để đưa vào mô hình đa biến hiệu chỉnh, từ đó đánh giá chính xác hơn giá trị tiên lượng độc lập của từng biến. Cách tiếp cận theo từng bước này phù hợp với các khuyến cáo phương pháp luận trong nghiên cứu y sinh và đảm bảo tính chặt chẽ trong phân tích thống kê của luận án [88,144].

Kết quả phân tích cho thấy các yếu tố lâm sàng nền của người mẹ, bao gồm tuổi mẹ, BMI và độ dày niêm mạc tử cung, không thể hiện vai trò tiên lượng có ý nghĩa thống kê đối với cả hai kết cục làm tổ và thai diễn tiến. Điều này cho thấy trong quần thể nghiên cứu tương đối đồng nhất về đặc điểm nền, kết cục thai kỳ chủ yếu chịu ảnh hưởng bởi đặc tính sinh học của phôi hơn là các yếu tố lâm sàng của người

mẹ, phù hợp với nhận định của nghiên cứu trước đây trong bối cảnh chuyển đơn phôi nang chu kỳ rã đông [145].

Tuy nhiên, tuổi mẹ vẫn được cân nhắc đưa vào mô hình đa biến do vai trò gây nhiễu tiềm tàng đã được chứng minh trong y văn. Đặc biệt, tuổi mẹ được xem là yếu tố nền quan trọng có thể ảnh hưởng đồng thời đến chất lượng phôi, động học phát triển và kết cục thai kỳ, do đó cần được hiệu chỉnh trong các mô hình đa biến nhằm đảm bảo tính chính xác của ước lượng [146].

Ngược lại, tuổi phôi nang thể hiện giá trị tiên lượng rõ rệt trong hồi quy logistic đơn biến. Cụ thể, phôi nang ngày 6 có khả năng làm tổ và thai diễn tiến thấp hơn đáng kể so với phôi nang ngày 5. Kết quả này phù hợp với các bằng chứng trong nghiên cứu tổng quan hệ thống cho thấy sự chậm trễ trong quá trình tạo phôi nang phản ánh sự suy giảm tiềm năng phát triển nội tại của phôi, liên quan đến tỷ lệ bất thường nhiễm sắc thể cao hơn và giảm khả năng tương tác với niêm mạc tử cung [147].

Đối với các tiêu chí hình thái phôi nang, mô hình GEE đơn biến khẳng định chất lượng khối tế bào nội phôi ICM và lớp tế bào lá nuôi TE là những yếu tố tiên lượng mạnh mẽ và có ý nghĩa thống kê cao. So với phôi có ICM A, phôi có ICM B và đặc biệt là ICM C làm giảm đáng kể OR của làm tổ và thai diễn tiến. Tương tự, TE B và TE C cũng liên quan đến sự suy giảm rõ rệt xác suất đạt kết cục thuận lợi. Những phát hiện này phù hợp với vai trò sinh học then chốt của tế bào nội phôi ICM trong hình thành phôi thai và của tế bào lá nuôi TE trong quá trình bám dính, xâm nhập nội mạc tử cung cũng như hình thành bánh nhau [34,129,135].

Trong nghiên cứu này, mức độ nở phôi nang không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm làm tổ và không làm tổ cũng như nhóm thai diễn tiến và không thai diễn tiến ngay từ phân tích mô tả bằng kiểm định Chi-square. Kết quả này tiếp tục được khẳng định trong hồi quy logistic đơn biến, khi mức độ nở phôi không thể hiện giá trị tiên lượng độc lập đối với kết cục thai kỳ. Điều này đã được chúng tôi bàn luận sau khi phân tích mô tả mối liên quan của hình thái với kết quả thai bằng kiểm định Chi-square. Nhiều nghiên cứu cho thấy khi phôi đã đạt đến giai đoạn phôi nang hoàn chỉnh, phôi nang có mức độ nở từ BL3 trở lên được coi là mức độ nở phôi ở giai đoạn phôi rất tốt [135,34,129], vai trò tiên lượng của mức độ nở trở nên hạn chế so với chất lượng ICM và TE [136]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, mức độ nở phôi nang từ BL3 trở lên thuộc đánh giá là mức độ nở thuận lợi về sự phát triển của phôi, giải thích cho việc không có sự khác biệt về độ nở của phôi trong nghiên cứu.

Đáng chú ý, điểm EEVA thể hiện giá trị tiên lượng rõ rệt và có tính phân tầng trong mô hình GEE đơn biến. So với nhóm tham chiếu E1, các mức điểm EEVA cao

hơn (E3-E5) liên quan đến sự giảm dần ORs làm tổ và thai diễn tiến. Điều này cho thấy các bất thường hoặc chậm trễ trong động học phân chia sớm, được phản ánh qua hệ thống EEVA, có thể ảnh hưởng kéo dài đến tiềm năng phát triển của phôi ở giai đoạn phôi nang và kết cục lâm sàng sau chuyển phôi. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu sử dụng hệ thống time-lapse cho thấy động học phân chia sớm là dấu hiệu gián tiếp quan trọng của chất lượng phôi và khả năng làm tổ [42,44,138].

Bên cạnh đó, các thông số động học của phôi trong nghiên cứu (tSC, tM, tSB, tBL2 và tB) đều cho thấy mối liên quan nghịch có ý nghĩa thống kê với khả năng làm tổ và thai diễn tiến trong hồi quy logistic đơn biến. Cụ thể, thời gian đạt các mốc thông số động học phát triển trên càng muộn thì ORs đạt kết cục lâm sàng có thai, thai diễn tiến càng giảm. Những phát hiện này củng cố giả thuyết rằng sự chậm trễ trong động học phân chia và tạo phôi nang phản ánh bất thường trong điều hòa chu kỳ tế bào, chuyển hóa năng lượng và biểu hiện gen của phôi, từ đó làm suy giảm tiềm năng phát triển, khả năng làm tổ và thai diễn tiến của phôi [120,137,148].

3.5. Xây dựng và đánh giá mô hình tiên lượng kết quả làm tổ của phôi

Hồi quy logistic đa biến cho phép phối hợp nhiều biến số để dự báo tiềm năng làm tổ thay vì dùng đơn biến với kết quả không tốt. Nghiên cứu sử dụng hồi quy logistic với phương pháp GEE (Generalized Estimating Equations). Sàng lọc biến bằng phân tích đơn biến kết hợp với cơ sở lâm sàng, sau đó xây dựng và so sánh các mô hình đa biến theo nhóm yếu tố tiên lượng. Đầu tiên các biến được đánh giá bằng phân tích hồi quy đơn biến nhằm khảo sát mối liên quan của các biến với kết cục làm tổ. Sau khi thực hiện phân tích đơn biến, các biến có ý nghĩa thống kê có giá trị $p < 0,05$ hoặc với những biến có giá trị $p > 0,05$ nhưng có ý nghĩa lâm sàng (như tuổi mẹ, tuổi phôi) được lựa chọn để đưa vào mô hình đa biến nhằm đánh giá độc lập khả năng tiên lượng kết quả làm tổ của các biến. Việc lựa chọn này vừa đảm bảo tính khách quan về thống kê, vừa đảm bảo ý nghĩa sinh học, tránh loại sớm những yếu tố có thể gây nhiễu tiềm ẩn [89,88]. Đồng thời, các biến được kiểm tra hiện tượng đa cộng tuyến bằng hệ số phóng đại phương sai (VIF) và chỉ số dung sai (Tolerance). Những biến có hệ số phóng đại phương sai VIF > 5 hoặc chỉ số dung sai Tolerance < 0,2 được xem xét loại bỏ hoặc thay bằng biến đại diện có ít tương quan hơn [88].

Dựa trên mục tiêu nghiên cứu, các nhóm yếu tố tiên lượng và đặc điểm dữ liệu, năm mô hình hồi quy đa biến được xây dựng như bên dưới. Thành phần biến của từng mô hình được giữ nguyên trong quá trình đánh giá và so sánh hiệu năng tiên lượng, không loại bỏ biến chỉ dựa trên ý nghĩa thống kê riêng lẻ của hệ số hồi quy. Hiệu năng các mô hình được so sánh nhằm đánh giá khả năng tiên lượng của từng

nhóm yếu tố và giá trị bổ sung của việc kết hợp các đặc điểm hình thái, điểm EEVA và thông số động học trong tiên lượng kết quả chuyển phôi nang đông lạnh-rã đông.

3.5.1. Xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi

Mô hình 1-Hình thái học (Morphology model): Bao gồm các biến liên quan đến đặc điểm hình thái phôi theo hệ thống Gardner: điểm ICM (B, C so với A), điểm TE (B, C so với A), cùng các biến điều chỉnh bắt buộc là tuổi mẹ và tuổi phôi (ngày 6 so với ngày 5). Mô hình này nhằm đánh giá giá trị tiên lượng độc lập của hình thái phôi nang đối với khả năng làm tổ (Bảng **3.24**).

Bảng 3.24. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa hình thái với kết quả làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi

		Phân tích đa biến		
Đặc điểm		**aOR**	**95% CI**	**p**
Tuổi phôi (ngày 5 so với ngày 6)		-		0,759
Điểm ICM	ICM B vs ICM A	-		0,073
	ICM C vs ICM A	-		0,929
Điểm TE	TE B vs TE A	0,405	0,240-0,683	**0,001**
	TE C vs TE A	0,072	0,017-0,293	< **0,001**

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): Khoảng tin cậy 95%; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê. GEE: Generalized Estimating Equations – Phương trình ước lượng tổng quát. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi. TE: trophectoderm - tế bào lá nuôi

Trong mô hình GEE đa biến, tuổi phôi (ngày 5 so với ngày 6) không có ý nghĩa thống kê (p = 0,759). Về đặc điểm hình thái phôi, điểm ICM không giữ được ý nghĩa độc lập trong mô hình GEE đa biến (ICM B so với A: p = 0,073; ICM C so với A: p = 0,929). Ngược lại, điểm TE giữ được ý nghĩa thống kê độc lập: TE B so với A (*aOR* = 0,405; 95% CI 0,240-0,683; p = 0,001), TE C so với A (*aOR* = 0,072; 95% CI 0,017-0,293; p < 0,001).

Mô hình 2-EEVA (EEVA model): Bao gồm các biến liên quan đến điểm EEVA (E2-E5 so với E1), cùng các biến điều chỉnh bắt buộc là tuổi mẹ và tuổi phôi (ngày 6 so với ngày 5). Mô hình này nhằm đánh giá giá trị tiên lượng độc lập của phần mềm EEVA với khả năng làm tổ (Bảng **3.25**).

Bảng 3.25. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa điểm EEVA với kết quả làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi

		Phân tích đa biến		
Đặc điểm		**aOR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Tuổi phôi (ngày 5 vs ngày 6)		-		0,074
	E2 vs E1	0,795	0,486-1,301	0,362

Điểm EEVA	E3 vs E1	0,350	0,201-0,607	**< 0,001**
	E4 vs E1	0,288	0,151-0,546	**< 0,001**
	E5 vs E1	0,282	0,125-0,636	**0,002**

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy 95%; p < 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp Generalized Estimating Equations (GEE). E: điểm EEVA.

Trong mô hình GEE đa biến, tuổi phôi (ngày 5 so với ngày 6) không có ý nghĩa thống kê (p = 0,074). Đối với điểm EEVA, kết quả cho thấy các phân độ cao hơn (E3-E5 so với E1) đều có mối liên quan độc lập và có ý nghĩa thống kê với khả năng làm tổ: E3 (*aOR* = 0,350; 95% CI 0,201-0,607; p < 0,001), E4 (*aOR* = 0,288; 95% CI 0,151-0,546; p < 0,001) và E5 (*aOR* = 0,282; 95% CI 0,125-0,636; p = 0,002). Phân độ E2 so với E1 không có ý nghĩa (*aOR* = 0,795; 95% CI 0,486-1,301; p = 0,362).

Mô hình 3-Động học (Morphokinetic model): Bao gồm các thông số thời gian phát triển của phôi (tSC, tM, tSB, tBL2, tB), cùng các biến điều chỉnh là tuổi mẹ và tuổi phôi. Mô hình này xây dựng nhằm xác định vai trò độc lập của động học phát triển phôi trong tiên lượng làm tổ (Bảng **3.26**).

Bảng 3.26. Mô hình GEE đánh giá mối liên hệ giữa điểm các thông số động học với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ và tuổi phôi

	Phân tích đa biến		
Đặc điểm	**aOR**	**95% CI**	**Giá trị p**
tSC	0,985	0,958-1,012	0,268
tM	1,016	0,980-1,052	0,394
tSB	1,002	0,994-1,010	0,590
tBL2	0,951	0,917-0,986	**0,006**
tB	1,004	0,987-1,021	0,662

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy 95%; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE - Generalized Estimating Equations. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi nang. ICM: inner cell mass-tế bào nội phôi. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi. BL: mức độ nở của phôi nang

Trong mô hình GEE đa biến, chỉ có tBL2 giữ được ý nghĩa thống kê (p = 0,006) với aOR = 0,951 (95% CI 0,917-0,986), cho thấy mỗi 1 giờ tăng thời gian hình thành khoang phôi nang làm giảm 4,9% khả năng làm tổ. Các thông số còn lại (tSC,

tM, tSB, tB) mặc dù có liên quan trong phân tích đơn biến nhưng không giữ được ý nghĩa độc lập khi kiểm soát các biến khác. Điều này nhấn mạnh tBL2 là chỉ số động học quan trọng nhất, phản ánh vai trò quyết định của giai đoạn hình thành khoang phôi nang trong tiên lượng khả năng làm tổ.

Mô hình 4-Mô hình kết hợp EEVA và hình thái (EEVA - Morphology model): Bao gồm các biến liên quan đến đặc điểm hình thái phôi theo hệ thống Gardner: điểm ICM (B, C so với A), điểm TE (B, C so với A), biến liên quan đến điểm EEVA (E2-E5 so với E1), cùng các biến điều chỉnh bắt buộc là tuổi mẹ và tuổi phôi (ngày 6 so với ngày 5), cùng các biến điều chỉnh bắt buộc là tuổi mẹ và tuổi phôi (ngày 6 so với ngày 5). Mô hình này dùng để đánh giá giá trị cộng hưởng khi tích hợp EEVA với hình thái phôi đối với khả năng làm tổ (Bảng **3.27**).

Bảng 3.27. Mô hình GEE đánh giá giá trị cộng hưởng khi kết hợp EEVA với hình thái phôi đối với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ, tuổi phôi

		Phân tích đa biến			
Đặc điểm		**Hệ số β**	**aOR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Tuổi mẹ		-0,011	0,989	0,943-1,038	0,569
Tuổi phôi (ngày 6 vs ngày 5)		-0,244	0,783	0,361-1,699	0,559
Điểm ICM	ICM B vs ICM A	-0,362	0,696	0,391-1,699	0,214
	ICM C vs ICM A	-0,785	0,456	0,383-4,553	0,699
Điểm TE	TE B vs TE A	-0,838	0,436	0,256-0,742	**0,002**
	TE C vs TE A	-2,715	0,065	0,016-0,267	**< 0,001**
Điểm EEVA	E2 vs E1	-0,078	0,928	0,552-1,563	0,780
	E3 vs E1	-0,656	0,514	0,282-0,935	**0,029**
	E4 vs E1	-0,929	0,402	0,199-0,810	**0,011**
	E5 vs E1	-1,085	0,338	0,258-0,591	**0,017**
Hệ số chặn		2,108			

Chú thích: Hệ số β: hệ số hồi quy, OR (Odds ratio): Tỷ số chênh; CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy 95%; p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE - Generalized Estimating Equations. TE: trophectoderm - tế bào lá nuôi. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi. E: Điểm EEVA

Trong mô hình GEE đa biến tích hợp (EEVA + hình thái phôi), tuổi phôi (ngày 5 so với ngày 6) không có ý nghĩa thống kê (p = 0,559). Về các đặc điểm hình thái, điểm ICM (ICM B so với A: p = 0,214; ICM C so với A: p = 0,699) không có ý nghĩa thống kê, trong khi điểm TE: TE B so với A (*aOR* = 0,436; 95% CI 0,256-0,742; p =

0,002), TE C so với A (*aOR* = 0,065; 95% CI 0,016-0,267; *p* < 0,001), có ý nghĩa thống kê. Đối với điểm EEVA, phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn (E3-E5) so với phôi ngày 3 có điểm E1 giữ được ý nghĩa thống kê độc lập: E3 (*aOR* = 0,514; 95% CI 0,282-0,935; *p* = 0,029), E4 (*aOR* = 0,402; 95% CI 0,199-0,810; *p* = 0,011), E5 (*aOR* = 0,338; 95% CI 0,258-0,591; *p* = 0,017), trong khi phôi có điểm E2 so với E1 không có ý nghĩa (*aOR* = 0,928; 95% CI 0,552-1,563; *p* = 0,780).

Từ Bảng **3.27**, phương trình mô hình hồi quy được xây dựng tương ứng:

Logit (p) = ln $(\frac{1}{1-p})$ = 2,108 – 0,011 (tuổi mẹ) – 0,244 (tuổi phôi ngày 6) – 0,362 (ICM B) – 0,785 (ICM C) – 0,838 (TE B) – 2,715 (TE C) – 0,078 (E2) – 0,656 (E3) – 0,929 (E4) – 1,085 (E5)

Trong phương trình: Với p là xác suất xảy ra kết cục, 2,108 là hệ số chặn của mô hình. Các hệ số âm biểu thị mối liên quan nghịch giữa biến tương ứng. Tuổi mẹ: nhập tuổi thực tế. Tuổi phôi ngày 6: nhập 1 nếu là phôi ngày 6, 0 nếu là phôi ngày 5, ngày 5 là nhóm tham chiếu. ICM B, ICM C: nhập 1 nếu thuộc nhóm tương ứng, 0 nếu không; nhóm ICM A là nhóm tham chiếu. TE B, TE C: nhập 1 nếu thuộc nhóm tương ứng, 0 nếu không; nhóm TE A là nhóm tham chiếu. E2, E3, E4, E5: nhập 1 nếu thuộc nhóm tương ứng, 0 nếu không; nhóm E1 là nhóm tham chiếu.

Mô hình 5-Mô hình kết hợp (EEVA-morphology-morphokinetic model): Kết hợp điểm EEVA (E2–E5 so với E1), các đặc điểm hình thái (ICM, TE), thông số động học đại diện (tSC, tM, tSB, tBL2, tB), cùng tuổi mẹ và tuổi phôi. Mô hình này dùng để đánh giá giá trị cộng hưởng khi kết hợp EEVA với các chỉ số hình thái và động học nhằm nâng cao khả năng tiên lượng kết quả làm tổ (Bảng **3.28**).

Bảng 3.28. Mô hình GEE đánh giá giá trị cộng hưởng khi kết hợp EEVA, hình thái phôi nang và các thông số động học đối với khả năng làm tổ, hiệu chỉnh với tuổi mẹ, tuổi phôi

		Phân tích đa biến		
Đặc điểm		**aOR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Tuổi phôi (ngày 5 vs ngày 6)		1,296	0,540–3,113	0,562
Điểm EEVA	E2 vs E1	0,928	0,549 – 1,568	0,780
	E3 vs E1	0,515	0,282 – 0,940	**0,031**
	E4 vs E1	0,404	0,199 – 0,821	**0,012**
	E5 vs E1	0,399	0,274 – 0,785	**0,030**
Điểm ICM	ICM B vs A	0,682	0,378 – 1,229	0,203
	ICM C vs A	1,294	0,329 – 5,093	0,712
Điểm TE	TE B vs A	0,432	0,251 – 0,743	**0,002**
	TE C vs A	0,064	0,016 – 0,267	**< 0,001**

		Phân tích đa biến		
Đặc điểm		**aOR**	**95% CI**	**Giá trị p**
Động học	tSC	0,991	0,962 – 1,021	0,559
	tM	1,024	0,985 – 1,064	0,231
	tSB	1,001	0,992 – 1,010	0,794
	tBL2	0,976	0,893 – 1,067	0,595
	tB	1,008	0,928 – 1,095	0,850

Chú thích: OR (Odds ratio): Tỷ số chênh. CI (Confidence Interval): khoảng tin cậy 95%. p < 0,05 có ý nghĩa thống kê về mối liên hệ giữa biến số và kết quả. Phân tích được thực hiện bằng mô hình hồi quy logistic với phương pháp GEE Generalized Estimating Equations. tSC: thời gian phôi bắt đầu nén. tM: thời gian phôi hoàn thành quá trình nén. tSB: thời gian phôi bắt đầu tạo khoang. tBL2: thời gian khoang phôi nang bằng ½ thể tích phôi. tB: thời gian đạt khoang phôi nang đầy. BL: độ nở của phôi nang. ICM: inner cell mass - tế bào nội phôi. TE: trophectoderm-tế bào lá nuôi. BL: mức độ nở của phôi nang. E: điểm EEVA, Early embryo viability assessment, phần mềm đánh giá khả năng sống của phôi giai đoạn sớm

Phân tích mô hình GEE đa biến cho thấy, tuổi phôi (ngày 5 so với ngày 6) (aOR = 1,296; 95% CI: 0,540-3,113; p = 0,562), không có ý nghĩa thống kê. Về điểm EEVA, khi so sánh với nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA thấp nhất (E1), các nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA cao hơn cho thấy xu hướng giảm khả năng làm tổ. Cụ thể, nhóm phôi ngày 3 có điểm EEVA là E3, E4 và E5 có xác suất làm tổ thấp hơn đáng kể so với nhóm phôi có điểm E1 (E3: aOR = 0,515; 95% CI: 0,282-0,940; p = 0,031; E4: aOR = 0,404; 95% CI: 0,199-0,821; p = 0,012; E5: aOR = 0,399; 95% CI: 0,274-0,785; p = 0,030). Xét về chất lượng hình thái ICM, không ghi nhận mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa phân loại ICM và khả năng làm tổ (ICM B so với A: aOR = 0,682; 95% CI: 0,378-1,229; p = 0,203; ICM C so với A: aOR = 1,294; 95% CI: 0,329-5,093; p = 0,712). Ngược lại, chất lượng hình thái TE cho thấy ảnh hưởng đáng kể đến khả năng làm tổ. So với nhóm TE loại A, cả TE loại B và C đều có xác suất làm tổ giảm rõ rệt (TE B: aOR = 0,432; 95% CI: 0,251-0,743; p = 0,002; TE C: aOR = 0,064; 95% CI: 0,016-0,267; p < 0,001), có ý nghĩa thống kê. Đối với các thông số động học, bao gồm tSC, tM, tSB, tBL2, tB, không có thông số nào ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến khả năng làm tổ ở trong mô hình đa biến (p > 0,05).

3.5.2. So sánh hiệu quả và lựa chọn mô hình

Trong nghiên cứu này, để so sánh khả năng phân biệt (discrimination ability) giữa hai mô hình dự báo, chúng tôi sử dụng AUC của đường cong ROC, được ước tính bằng phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) với 1.000 lần lấy mẫu lại (Bảng **3.29**). So sánh hiệu năng phân biệt giữa các cặp mô hình được thực hiện thông qua chênh lệch AUC (ΔAUC). Do một bệnh nhân có thể đóng

góp nhiều chu kỳ chuyển phôi, phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) được sử dụng để tính toán khoảng tin cậy 95% của chênh lệch AUC, bảo đảm duy trì cấu trúc phụ thuộc giữa các chu kỳ của cùng một bệnh nhân. Việc so sánh được thực hiện trên cùng tập dữ liệu và cùng đơn vị lấy mẫu lại cho các mô hình trong mỗi lần bootstrap. Mức ý nghĩa thống kê được xác định là $p < 0,05$ [92] Bảng **3.30**.

Bảng 3.29. Khả năng phân biệt của các mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi nang

Mô hình	AUC (95% CI)	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	Độ chính xác (%)
1	0,703 (0,653-0,752)	85,4	42,9	71,3
2	0,655 (0,605-0,704)	88,3	30,4	69,2
3	0,624 (0,571-0,675)	96,2	10,1	67,8
4	0,730 (0,681-0,775)	89,6	33,9	71,7
5	0,737 (0,692-0,781)	89,5	33,9	71,3

Chú thích: AUC (area under the receiver operating characteristic curve): diện tích dưới đường cong ROC; 95% CI: 95% Confidence Interval: KTC 95%: khoảng tin cậy 95%, được ước tính bằng phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) với 1.000 lần lấy mẫu lại. Mô hình 1: Hình thái học; Mô hình 2: EEVA; Mô hình 3: Động học; Mô hình 4: kết hợp EEVA và hình thái; Mô hình 5: kết hợp EEVA, hình thái, động học

Bảng **3.29** cho thấy tất cả năm mô hình tiên lượng đều có giá trị AUC dao động từ 0,624 đến 0,737, phản ánh khả năng phân biệt từ mức trung bình đến tốt trong dự đoán kết quả làm tổ sau chuyển đơn phôi nang chu kỳ rã đông. Trong đó, mô hình 4 và mô hình 5 đạt AUC cao (0,730 và 0,737), vượt trội hơn so với các mô hình chỉ dựa trên một yếu tố đơn thuần (M1, M2, và M3). Cả hai mô hình này đều có độ nhạy cao (khoảng 89,6% và 89,5%), độ chính xác đạt (71,7% và 71,3%). Mô hình 3 (động học đơn thuần) có AUC thấp nhất (0,624) và độ đặc hiệu chỉ 10,1%, cho thấy khả năng phân loại kém. Mô hình 4 (Hình thái + EEVA) và mô hình 5 (Hình thái + EEVA + Động học) có giá trị AUC là 0,730 và 0,737, chưa thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, mô hình 4 có độ nhạy (89,6%) và độ chính xác (71,7%) cao hơn nhẹ so với mô hình 5 (89,5% và 71,3%).

Bảng 3.30. So sánh chênh lệch AUC giữa các cặp mô hình tiên lượng kết quả chuyển phôi nang bằng phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân

Cặp mô hình	ΔAUC	95% CI	p bootstrap
M1 vs M2	0,048	-0,005 đến 0,104	0,100
M1 vs M3	**0,079**	**0,013 đến 0,145**	**0,016**

Cặp mô hình	ΔAUC	95% CI	p bootstrap
M1 vs M4	**-0,027**	**-0,052 đến -0,001**	**0,048**
M1 vs M5	**-0,034**	**-0,068 đến -0,009**	**0,050**
M2 vs M3	0,030	-0,023 đến 0,084	0,278
M2 vs M4	**-0,075**	**-0,116 đến -0,034**	**0,001**
M2 vs M5	**-0,083**	**-0,126 đến -0,039**	**0,001**
M3 vs M4	**-0,105**	**-0,165 đến -0,045**	**0,001**
M3 vs M5	**-0,113**	**-0,162 đến -0,065**	**0,001**
M4 vs M5	-0,007	-0,029 đến 0,013	0,447

Chú thích: ΔAUC: chênh lệch diện tích dưới đường cong ROC giữa hai mô hình; 95% CI: 95% Confidence Interval: KTC 95%: khoảng tin cậy 95%. Chênh lệch AUC và KTC 95% được ước tính bằng phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) với 1.000 lần lấy mẫu lại, nhằm tính đến sự phụ thuộc giữa các chu kỳ chuyển phôi của cùng một bệnh nhân. p<0,05, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mô hình 1, M1: Hình thái học; Mô hình 2, M2: EEVA; Mô hình 3, M3: Động học; Mô hình 4, M4: kết hợp EEVA và hình thái; Mô hình 5, M5: kết hợp EEVA, hình thái, động học

Kết quả ở Bảng **3.30** cho thấy, việc bổ sung EEVA vào mô hình hình thái giúp AUC tăng từ 0,703 lên 0,730 (ΔAUC = 0,027; p = 0,048), trong khi bổ sung hình thái vào mô hình EEVA giúp AUC tăng từ 0,655 lên 0,730 (ΔAUC = 0,075; p = 0,001). Ngược lại, bổ sung các thông số động học vào mô hình EEVA kết hợp hình thái chỉ làm AUC tăng 0,007 (từ 0,730 lên 0,737), không có ý nghĩa thống kê (p = 0,447).

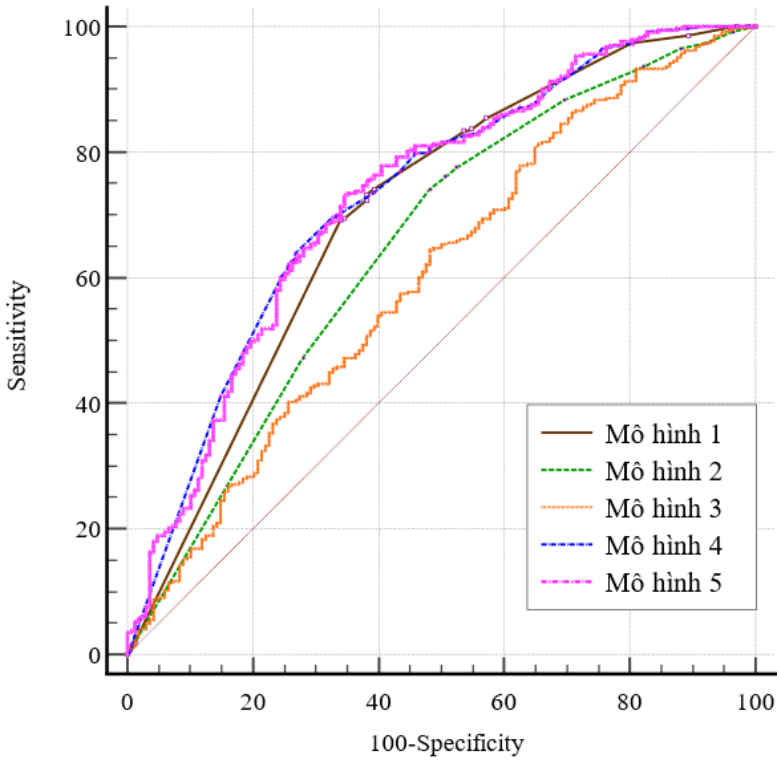
Trong nghiên cứu này, khi so sánh trực tiếp hiệu năng phân biệt giữa các mô hình (Bảng **3.30,** Hình **3.5)**, mô hình M5 có giá trị AUC cao nhất (0,737), tiếp theo là mô hình M4 (0,730). Tuy nhiên, chênh lệch AUC giữa hai mô hình chỉ là 0,007 và không có ý nghĩa thống kê trong phân tích bootstrap (p = 0,447; 95% CI: -0,029 đến 0,013). Kết quả này chưa cho thấy việc bổ sung các thông số động học hình thái phôi nang vào mô hình kết hợp tuổi người mẹ, tuổi phôi, EEVA và các thông số hình thái ICM, TE giúp cải thiện rõ rệt khả năng phân biệt kết quả làm tổ. Mặt khác, các mô hình kết hợp (M4, M5) có AUC (0,730 và 0,737) cao hơn rõ rệt so với các mô hình đơn lẻ (M1, M2 và M3) có AUC lần lượt (0,703, 0,655 và 0,624), với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Xét trên phương diện xây dựng mô hình tiên lượng, mô hình có AUC cao nhất không nhất thiết là mô hình tối ưu nhất. Việc lựa chọn cần đồng thời cân nhắc khả năng phân biệt, độ hiệu chỉnh, lợi ích lâm sàng, tính đơn giản và khả năng triển khai trong thực hành. So với mô hình 4, mô hình 5 có mức độ phức tạp cao hơn. Đồng thời, trong mô hình 5, các thông số động học riêng lẻ không còn là yếu tố dự báo độc lập, gợi ý rằng phần lớn giá trị tiên lượng của chúng đã được phản ánh thông qua

điểm EEVA và TE. Theo nguyên tắc tính giản lược (parsimony principle) trong xây dựng mô hình tiên lượng, khi hai mô hình có hiệu năng tương đương, mô hình được ưu tiên là mô hình đơn giản hơn để giảm nguy cơ quá khớp (overfitting) và tăng tính khả thi trong ứng dụng lâm sàng [93,150]. Trong bối cảnh nghiên cứu này, M4 có thể được ưu tiên hơn M5 do cấu trúc gọn hơn trong khi khả năng phân biệt quan sát được chưa cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Do đó mô hình cuối cùng chúng tôi lựa chọn trong nghiên cứu là mô hình 4, mô hình kết hợp giữa EEVA và hình thái. Sau đây chúng tôi sẽ tiến hành nội kiểm mô hình 4 sử dụng phương pháp lấy mẫu lặp lại Bootstrap (lấy mẫu 1000 lần).

Mặc dù mô hình tiên lượng cuối cùng chỉ còn hai biến độc lập, cỡ mẫu của nghiên cứu được xác định dựa trên bảy biến theo đúng nguyên tắc xây dựng mô hình tiên lượng. Do đó, cỡ mẫu nghiên cứu không những đáp ứng yêu cầu của mô hình cuối cùng mà còn góp phần nâng cao tính ổn định và độ tin cậy của các ước lượng.



Hình 3.5. Đường cong ROC so sánh hiệu quả các mô hình tiên lượng

(Mô hình 1: Hình thái học; Mô hình 2: EEVA; Mô hình 3: Động học; Mô hình 4: Kết hợp EEVA và hình thái; Mô hình 5: Kết hợp EEVA, hình thái, động học). Sensitivity: Độ nhạy, Specificity: Độ đặc hiệu

3.5.3. Nội kiểm mô hình xây dựng được chọn (Mô hình 4-mô hình kết hợp EEVA và hình thái)

Chúng tôi sử dụng phương pháp lấy mẫu lặp lại Bootstrap (lấy mẫu 1000 lần)

để nội kiểm chuẩn mô hình và xây dựng biểu đồ hiệu chuẩn [90]. Cụ thể, chúng tôi nội kiểm chuẩn mô hình được lựa chọn cuối cùng là mô hình 4 - mô hình kết hợp EEVA và hình thái bằng phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp (B = 1000), nhằm đánh giá khả năng phân biệt (discrimination) và mức độ quá khớp (overfitting) của mô hình [90].

Bảng 3.31. Kết quả nội kiểm chuẩn mô hình 4 - Mô hình kết hợp EEVA và hình thái bằng phương pháp Bootstrapping (B = 1000)

Thông số	Giá trị	Ý nghĩa
AUC (apparent)	0,73	Khả năng phân biệt của mô hình ban đầu
AUC (optimism-corrected)	0,72	Khả năng phân biệt sau khi hiệu chỉnh bằng bootstrap
Optimism in AUC	0,01	Chênh lệch giữa AUC ban đầu và AUC đã hiệu chỉnh
95% CI for AUC	0,69–0,78	Khoảng tin cậy 95% cho khả năng phân biệt

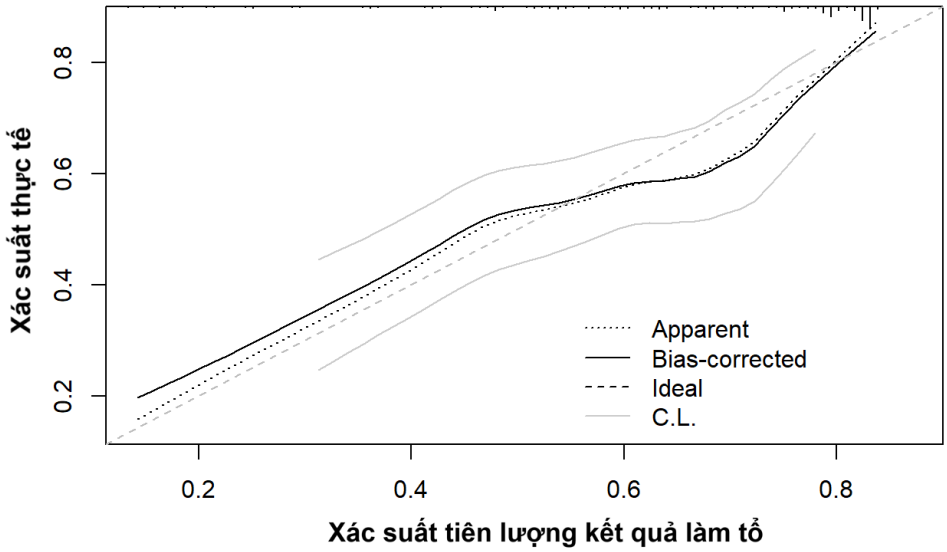
Chú thích: Nội kiểm chuẩn mô hình bằng phương pháp Bootstrapping (B=1000). ***AUC:*** *Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve (Diện tích dưới đường cong ROC.* ***Bootstrap (B = 1000)****: Phương pháp rút mẫu có thay thế lặp lại 1000 lần để đánh giá độ ổn định và hiệu chỉnh lạc quan của mô hình.* ***Optimism****: Mức độ quá khớp trong hiệu năng mô hình trên dữ liệu huấn luyện; dùng để đánh giá mức độ quá khớp overfitting.* ***CI 95%:*** *Confidence Interval-Khoảng tin cậy 95% cho AUC, xác định mức độ chắc chắn của chỉ số*

Bảng **3.31** trình bày kết quả nội kiểm chuẩn mô hình dự báo bằng phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp (B = 1000), nhằm đánh giá khả năng phân biệt (discrimination) và mức độ quá khớp (overfitting) của mô hình. Kết quả cho thấy mô hình dự báo có AUC ban đầu (apparent) = 0,73, trong khi AUC hiệu chỉnh (optimism-corrected) = 0,72, chứng tỏ hiệu năng mô hình giữ ổn định sau khi hiệu chỉnh. Optimism = 0,01, mức lạc quan rất thấp, cho thấy mô hình gần như không bị overfitting. Khoảng tin cậy 95% cho AUC = 0,69-0,78**,** phản ánh độ chắc chắn cao của khả năng phân biệt.

Như vậy, nội kiểm cho thấy mô hình ổn định, đáng tin cậy và có thể áp dụng trên các mẫu dữ liệu tương tự ngoài mẫu huấn luyện. Việc sử dụng bootstrap với số lần lặp lớn giúp kiểm tra khả năng tổng quát hóa của mô hình, giảm thiểu rủi ro đánh giá quá mức hiệu năng trên tập huấn luyện. Điều này khẳng định rằng mô hình không chỉ phù hợp với dữ liệu nghiên cứu mà còn có tiềm năng áp dụng trong thực hành lâm sàng với các quần thể bệnh nhân tương tự [93,94].

Với AUC đạt 0,72, mô hình có khả năng phân biệt ở mức khá giữa các phôi có và không có khả năng làm tổ. Điều này có nghĩa là khi so sánh ngẫu nhiên một phôi làm tổ thành công và một phôi không làm tổ, mô hình sẽ xếp xác suất của phôi

làm tổ cao hơn khoảng 72% số trường hợp. Mặc dù giá trị này chưa đạt mức rất cao, nhưng trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản, kết quả làm tổ chịu ảnh hưởng đồng thời của nhiều yếu tố như chất lượng phôi, tuổi mẹ, khả năng tiếp nhận của nội mạc tử cung và các yếu tố sinh học chưa đo lường được. Vì vậy, việc đạt AUC trên 0,70 được xem là có giá trị ứng dụng trong hỗ trợ ra quyết định lâm sàng.



Hình 3.6. Biểu đồ hiệu chuẩn (calibration plot)

Biểu đồ hiệu chuẩn của mô hình 4 sau hiệu chỉnh bootstrap (n = 511). Thể hiện mức độ phù hợp giữa xác suất dự đoán và xác suất quan sát thực tế của mô hình tiên lượng, nội kiểm bằng phương pháp bootstrap. Trục hoành biểu diễn xác suất tiên lượng kết quả làm tổ do mô hình dự đoán; trục tung biểu diễn xác suất quan sát thực tế. Đường gạch đứt (Ideal) biểu thị hiệu chuẩn hoàn hảo (đường 45^0). Đường chấm (Apparent) thể hiện hiệu chuẩn trên bộ dữ liệu gốc. Đường liền (Bias-corrected) là đường hiệu chuẩn sau khi đã hiệu chỉnh sai lệch lạc quan bằng 1000 lần bootstrap. Các đường màu xám (Confidence Limits C.L.) biểu thị khoảng tin cậy 95%. Độ lệch trung bình (Mean absolute error MAE) = 0,028. Hệ số dốc (Calibration slope) = 0,91. Sai số bình phương trung bình (Mean squared error MSE) = 0,001. Giá trị phân vị thứ 90 của sai số tuyệt đối (90th percentile absolute error) = 0,053. Chỉ số Brier (Brier score) được sử dụng để đánh giá độ chính xác tổng thể của mô hình = 0,18. Sử dụng phần mềm ngôn ngữ thống kê R 4.5.2.

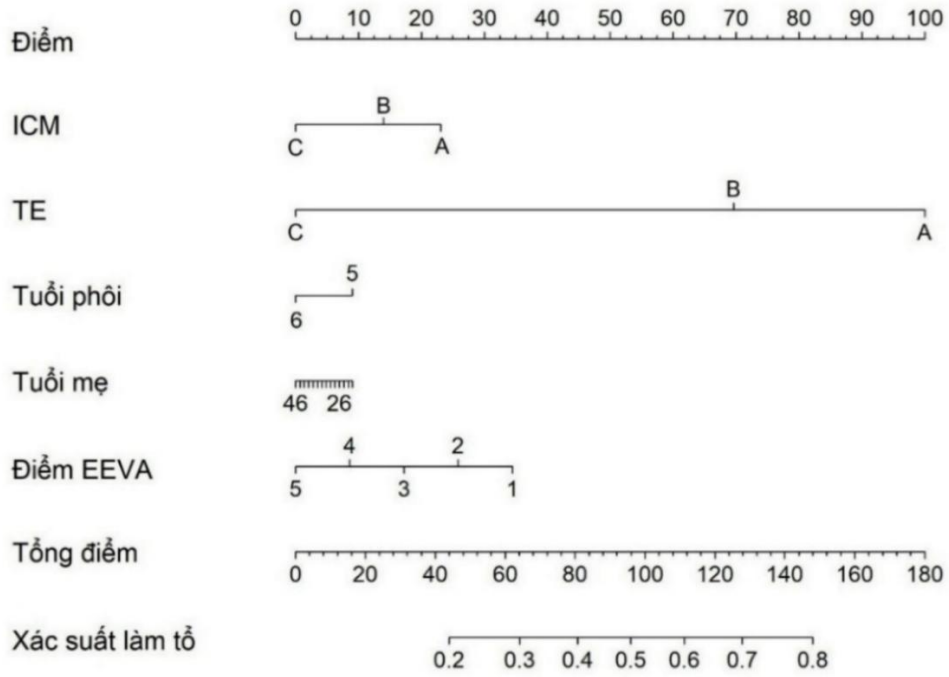
Biểu đồ hiệu chuẩn sau hiệu chỉnh bootstrap (Hình **3.6**) cho thấy đường hiệu chỉnh sai lệch lạc quan (bias-corrected) nằm tương đối sát đường lý tưởng (Ideal), phản ánh sự phù hợp tốt giữa xác suất dự đoán và xác suất quan sát thực tế của mô hình tiên lượng trong quần thể nghiên cứu. So với đường hiệu chuẩn quan sát ban đầu (Apparent), đường hiệu chỉnh bootstrap chỉ có sai khác nhỏ, cho thấy mức độ lạc quan (optimism) của mô hình không đáng kể.

Hệ số dốc hiệu chuẩn (calibration slope) đạt 0,91, tiệm cận giá trị lý tưởng là

1. Điều này cho thấy mô hình có hiện tượng quá khớp (overfitting) rất nhẹ ở mức chấp nhận được. Độ lệch trung bình (Mean Absolute Error-MAE) là 0,028, chứng tỏ trung bình xác suất dự đoán chỉ sai lệch khoảng 2,8% so với xác suất thực tế. Sai số bình phương trung bình (Mean Squared Error-MSE) đạt 0,001, cho thấy không tồn tại sai lệch lớn bất thường trong phân bố dự đoán. Giá trị phân vị thứ 90 của sai số tuyệt đối là 0,053, nghĩa là 90% các dự đoán có sai lệch không quá 5,3%, phản ánh tính ổn định cao của mô hình, đây là mức rất tốt trong mô hình tiên lượng lâm sàng.

Chỉ số Brier phản ánh đồng thời cả khả năng phân biệt và hiệu chỉnh của mô hình. Biểu đồ hiệu chuẩn cho thấy mô hình có Brier score là 0,18 (Hình **3.6**). Brier score phản ánh sai số trung bình giữa xác suất dự đoán và kết quả thực tế. Giá trị càng thấp càng thể hiện khả năng dự đoán xác suất càng chính xác. Với Brier score 0,18, mô hình có mức sai số dự đoán tương đối thấp, chứng tỏ xác suất dự đoán của mô hình tương đối phù hợp với tỷ lệ làm tổ quan sát được. Điều này rất quan trọng trong thực hành lâm sàng, bởi mục tiêu của mô hình không chỉ là phân biệt phôi tốt và phôi kém mà còn phải cung cấp xác suất làm tổ đáng tin cậy để hỗ trợ bác sĩ và bệnh nhân trong quá trình tư vấn.

3.5.4. Biểu đồ nomogram dự đoán xác suất làm tổ sau chuyển một phôi nang đông lạnh - rã đông của mô hình được chọn.



Hình 3.7. Nomogram dự đoán xác suất làm tổ sau chuyển một phôi nang đông lạnh - rã đông của mô hình 4.

ICM: Inner cell mass - khối tế bào nội phôi; TE: Trophectoderm – lớp tế bào lá nuôi; EEVA: Điểm EEVA của phần mềm đánh giá phôi, Early Embryo Viability Assessment

Nomogram được xây dựng từ mô hình hồi quy logistic đa biến nhằm dự đoán xác suất làm tổ sau chuyển một phôi nang duy nhất. Các biến độc lập được đưa vào mô hình gồm: chất lượng khối tế bào nội phôi (ICM: inner cell mass), chất lượng lớp tế bào lá nuôi (TE-trophectoderm), tuổi phôi (ngày 5 hoặc ngày 6), tuổi mẹ và điểm EEVA. Để sử dụng nomogram, trước tiên xác định giá trị của từng biến ở bệnh nhân và phôi được đánh giá. Với mỗi biến, kẻ một đường thẳng vuông góc từ giá trị tương ứng lên trục "Điểm" để xác định số điểm của biến đó. Cộng điểm của tất cả các biến để thu được tổng điểm, sau đó xác định vị trí tổng điểm trên trục "Tổng điểm". Từ vị trí này, kẻ đường thẳng vuông góc xuống trục "Xác suất làm tổ" để xác định xác suất dự đoán của trường hợp được đánh giá. Một ví dụ minh họa: Giả sử một trường hợp có phôi nang ngày 5, ICM loại A, TE loại B, tuổi mẹ 30 tuổi và điểm EEVA phôi ngày 3 là E1. Tra nomogram để xác định điểm tương ứng với từng biến, lần lượt là (điểm ICM A: 22), (điểm TE B: 70), (điểm tuổi phôi ngày 5: 10), (điểm tuổi mẹ 30: 10) và (điểm EEVA 1: 30). Tổng điểm của trường hợp này được tính bằng tổng điểm của năm biến là 142. Từ tổng điểm thu được, đối chiếu với trục "Xác suất làm tổ" để xác định xác suất dự đoán tương ứng khoảng 78%. Nomogram cho phép ước tính xác suất làm tổ một cách cá thể hóa dựa trên sự kết hợp đồng thời giữa các yếu tố hình thái phôi, phần mềm EEVA, tuổi phôi và tuổi mẹ.

Kết quả nghiên cứu xây dựng mô hình cho thấy giá trị tiên lượng khả năng làm tổ của phôi không đồng đều giữa các nhóm mô hình, và sự kết hợp đa nguồn thông tin mang lại hiệu quả vượt trội so với tiếp cận đơn lẻ. Các mô hình chỉ dựa trên một nhóm biến tiên lượng riêng biệt (hình thái, EEVA hoặc động học) đều cho khả năng phân biệt ở mức trung bình. Mô hình hình thái học (M1) đạt AUC 0,703, cao hơn mô hình EEVA đơn thuần (M2: AUC 0,655) và mô hình động học đơn thuần (M3: AUC 0,624), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa M1 và M2. Điều này củng cố vai trò trung tâm của đánh giá hình thái phôi nang trong thực hành lâm sàng hiện nay. Đặc biệt, trong mô hình đa biến, chỉ có chất lượng lớp tế bào lá nuôi TE giữ được ý nghĩa tiên lượng độc lập, trong khi khối tế bào nội phôi ICM không còn ý nghĩa sau hiệu chỉnh. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, cho thấy lớp tế bào lá nuôi TE liên quan chặt chẽ hơn với tỷ lệ làm tổ và kết cục sinh sống so với ICM, do TE trực tiếp tham gia quá trình tương tác và xâm nhập nội mạc tử cung [110,132–134].

Đối với mô hình tiên lượng 2, mô hình EEVA, các phân độ cao (E3-E5) cho thấy mối liên quan độc lập và có ý nghĩa thống kê với giảm khả năng làm tổ so với phân độ thấp hơn E1. Tuy nhiên, AUC của mô hình này chỉ đạt 0,655, thấp hơn mô hình hình thái, mặc dù không có ý nghĩa thống kê (p = 0,1). Điều này tương đồng với

nghiên cứu tổng quan hệ thống và phân tích cộng gộp của Armstrong và cộng sự (2019) trong tổng quan Cochrane, trong đó các hệ thống time-lapse hoặc thuật toán tự động khi sử dụng riêng lẻ chưa chứng minh được lợi ích vượt trội so với đánh giá hình thái truyền thống [149]. Mô hình động học (M3) có AUC thấp nhất 0,624, cho thấy khả năng phân loại hạn chế. Mặc dù tBL2 giữ được ý nghĩa độc lập (aOR = 0,951; p = 0,006), các thông số động học còn lại mất ý nghĩa trong phân tích đa biến. Điều này cho thấy các mốc thời gian phát triển riêng lẻ khó có thể phản ánh đầy đủ tiềm năng làm tổ nếu không được đặt trong bối cảnh hình thái và thuật toán được tổng hợp một cách đầy đủ có hệ thống hơn. Quan sát này phù hợp với nhiều nghiên cứu cho rằng động học có giá trị bổ sung hơn là thay thế hình thái [124,149].

Điểm nổi bật của nghiên cứu của chúng tôi là sự vượt trội rõ rệt của các mô hình kết hợp. Cả mô hình 4 (EEVA + hình thái) và mô hình 5 (EEVA + hình thái + động học) đều đạt AUC cao nhất (lần lượt là 0,730 và 0,737), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các mô hình đơn lẻ (phương pháp cluster bootstrap, $p < 0,05$). Điều này chứng minh rằng thông tin điểm EEVA và động học khi được kết hợp với đánh giá hình thái giúp tăng khả năng phân biệt. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa mô hình 4 và mô hình 5 không có ý nghĩa thống kê (p = 0,447), trong khi mô hình 5 phức tạp hơn đáng kể. Hơn nữa, trong mô hình 5, các thông số động học riêng lẻ không còn giữ được ý nghĩa độc lập, cho thấy phần lớn giá trị tiên lượng của động học đã được phản ánh thông qua điểm EEVA và TE. Theo nguyên tắc tính giản lược trong xây dựng mô hình tiên lượng (parsimony principle), khi hai mô hình có hiệu năng tương đương, mô hình đơn giản hơn nên được ưu tiên nhằm giảm nguy cơ quá khớp (overfitting) và tăng tính khả thi trong ứng dụng lâm sàng [93,150]. Kết quả nội kiểm bằng bootstrap (B = 1000) của mô hình 4 càng củng cố lựa chọn này. AUC ban đầu là 0,73 giảm rất nhẹ xuống 0,72 sau hiệu chỉnh lạc quan, với optimism chỉ 0,01. Mức lạc quan thấp cho thấy mô hình hầu như không bị quá khớp và có độ ổn định cao. Theo các khuyến cáo của mô hình tiên lượng, mô hình đa biến và các hướng dẫn phát triển mô hình tiên lượng hiện đại, báo cáo hiệu năng sau hiệu chỉnh lạc quan là bước quan trọng để đảm bảo tính tin cậy trước khi triển khai kiểm định ngoại kiểm [89].

Hiệu chuẩn là một thành phần cốt lõi trong đánh giá hiệu năng mô hình tiên lượng, phản ánh mức độ phù hợp giữa xác suất dự đoán và xác suất thực tế xảy ra biến cố. Trong nghiên cứu này, đường hiệu chuẩn sau hiệu chỉnh bootstrap bám sát đường lý tưởng cho thấy mô hình không chỉ có khả năng phân biệt (discrimination) mà còn dự đoán xác suất với độ chính xác cao. Hệ số dốc hiệu chuẩn 0,91 cho thấy mô hình có hiện tượng quá khớp (overfitting) rất nhẹ, giá trị này nằm trong ngưỡng (0,9-1,0), cho thấy mức độ suy giảm hiệu năng sau hiệu chỉnh là tối thiểu. Điều này

phù hợp với kích thước mẫu tương đối đủ (n = 511) và quy trình lựa chọn biến hợp lý, giúp hạn chế hiện tượng quá khớp. Giá trị MAE thấp (0,028) chứng tỏ sai lệch trung bình giữa xác suất dự đoán và quan sát là rất nhỏ, mang ý nghĩa lâm sàng tích cực. Trong bối cảnh tiên lượng kết quả làm tổ, sai lệch dưới 5% được xem là có thể chấp nhận, do đó mức 2,8% phản ánh độ tin cậy cao của mô hình. Đồng thời, MSE rất thấp (0,001) cho thấy không tồn tại nhóm nguy cơ nào bị dự đoán lệch quá mức. Điều này được củng cố thêm bởi giá trị phân vị thứ 90 của sai số tuyệt đối (0,053), cho thấy trong 90% các mức dự đoán, độ lệch giữa xác suất dự đoán và xác suất quan sát thực tế không vượt quá 5,3%, phần lớn các dự đoán đều ổn định và không có sai lệch lớn. Chỉ số Brier trong nghiên cứu này là 0,18 cho thấy xác suất tiên lượng của mô hình tương đối sát với kết cục thực tế. Trong các mô hình tiên lượng chỉ số Brier cao nhất là 0,25, cho thấy khả năng dự đoán thấp là 50% (Brier: bình phương chênh lệch giữa xác suất dự đoán của mô hình và kết quả thực tế). Các mô hình tiên lượng có giá trị ứng dụng lâm sàng tiềm năng thì chỉ số Brier phải thấp hơn 0,25. Chỉ số Brier trong nghiên cứu của chúng tôi được đánh giá là tốt ở trong các nghiên cứu [151]. Tổng hợp các chỉ số cho thấy mô hình đạt hiệu chuẩn tốt và ít bị ảnh hưởng bởi sai lệch lạc quan sau nội kiểm. Điều này phản ánh tính ổn định nội bộ của mô hình trong quần thể nghiên cứu ban đầu [151,152]. Như vậy, kết quả hiệu chuẩn cho thấy mô hình tiên lượng có độ tin cậy cao và có tiềm năng ứng dụng trong thực hành lâm sàng hỗ trợ quyết định lựa chọn phôi chuyển, tuy nhiên mô hình cần được kiểm định thêm về tính tổng quát trước khi triển khai rộng rãi ngoài trung tâm.

Tổng hợp các phân tích trên, mô hình kết hợp EEVA và hình thái (M4) là mô hình tối ưu trong nghiên cứu của chúng tôi. Mô hình đạt khả năng phân biệt cao nhất, có độ nhạy và độ chính xác tốt, ổn định sau nội kiểm, đồng thời đảm bảo tính giản lược và tính khả thi trong ứng dụng lâm sàng. Việc kết hợp đánh giá hình thái, đặc biệt là chất lượng lớp tế bào lá nuôi TE, với thuật toán EEVA tự động giúp khai thác đồng thời thông tin cấu trúc và động học phát triển của phôi, từ đó nâng cao độ chính xác trong lựa chọn chuyển đơn phôi. Đây là hướng tiếp cận phù hợp với xu thế cá thể hóa chọn phôi trong IVF hiện đại, nhằm tối ưu tỷ lệ làm tổ và giảm nguy cơ đa thai.

Trong những năm gần đây, phần mềm đánh giá lựa chọn phôi tự động đã trở thành hướng phát triển chủ đạo trong nghiên cứu lựa chọn phôi nhằm tối ưu hóa hiệu quả thụ tinh trong ống nghiệm, bổ sung cho các phương pháp đánh giá phôi truyền thống dựa trên hình thái và phân tích động học. Các nghiên cứu tổng quan và thực nghiệm gần đây đã chỉ ra rằng phần mềm đánh giá phôi tự động có tiềm năng cải thiện khả năng dự đoán kết quả làm tổ và tỷ lệ thai diễn tiến hơn các phương pháp truyền thống. Tuy nhiên, hiệu quả của các mô hình phụ thuộc vào cách kết hợp dữ

liệu, thuật toán và mục tiêu dự đoán cụ thể. Nghiên cứu tổng quan hệ thống và phân tích gộp gần đây ghi nhận rằng các phần mềm tự động cho việc đánh giá phôi đạt AUC trung bình khoảng 0,70 với độ nhạy khoảng 0,69 và độ đặc hiệu khoảng 0,62 trong dự đoán kết quả thai, cho thấy tiềm năng trung bình nhưng chưa vượt trội so với các phương pháp lâm sàng kết hợp nhiều yếu tố [153]. Phần mềm đánh giá phôi tự động nói chung có giá trị nhất khi được kết hợp với các nguồn dữ liệu đa dạng và có tính ứng dụng lâm sàng cao hơn, kết hợp cả hình thái, động học, dữ liệu bệnh nhân và các thông tin IVF cụ thể khác, điều mà mô hình M4 (EEVA + hình thái) trong nghiên cứu của chúng tôi cũng đang thể hiện khi đạt AUC cao (0,730) so với các mô hình đơn lẻ. Hiệu năng của mô hình M4 tương đương tầm trung đến khá của nhiều mô hình trong nghiên cứu tổng quan, cho thấy rằng kết hợp phương pháp truyền thống với các thông số tự động hóa có thể cho hiệu suất cao trong bối cảnh lâm sàng thực tế [153]. Những kết quả này tương đồng với quan sát của chúng tôi, mô hình kết hợp (M4) vượt trội hơn hẳn các mô hình đơn lẻ. Điều này cho thấy xu hướng phát triển các mô hình đa biến, trong đó phần mềm tự động đánh giá phôi đóng vai trò hỗ trợ hơn là thay thế hoàn toàn cho các chuyên viên phôi học.

Trong thiết kế nghiên cứu của chúng tôi có một số ưu điểm nổi bật. Nghiên cứu được thiết kế theo hướng quan sát phân tích nhằm xây dựng và so sánh các mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi nang dựa trên đặc điểm hình thái, thông số động học và hệ thống đánh giá phôi tự động EEVA. Cách tiếp cận này phù hợp với bản chất của nghiên cứu tiên lượng, trong đó mục tiêu không phải xác định quan hệ nhân quả tuyệt đối mà là ước lượng xác suất xảy ra một kết cục dựa trên tập hợp các biến dự đoán. Theo Steyerberg và cộng sự (2019) các nghiên cứu xây dựng mô hình tiên lượng cần đảm bảo ba thành tố cốt lõi: lựa chọn biến hợp lý, đánh giá hiệu năng phân biệt (discrimination) và hiệu chuẩn (calibration), và kiểm định nội bộ để kiểm soát mức độ quá khớp (overfitting) [93]. Xét trên các tiêu chí này, thiết kế nghiên cứu hiện tại có cơ sở phương pháp luận vững chắc.

Một điểm đặc biệt quan trọng trong các nghiên cứu lĩnh vực IVF là đơn vị sinh học (phôi) không hoàn toàn độc lập về mặt thống kê, do nhiều phôi có thể thuộc cùng một bệnh nhân. Nếu phân tích mỗi phôi như một quan sát độc lập mà không hiệu chỉnh sự phụ thuộc nội cụm, sai số chuẩn sẽ bị đánh giá thấp, làm tăng nguy cơ sai lầm loại I và thổi phồng ý nghĩa thống kê. Việc sử dụng mô hình hồi quy logistic GEE là lựa chọn phù hợp cho cụm dữ liệu hoặc dữ liệu quan sát không độc lập, có sự liên quan (clustered or correlated data) [154]. GEE cho phép ước lượng trung bình quần thể (population-averaged effect), điều này phù hợp với mục tiêu xây dựng mô hình tiên lượng áp dụng ở mức lâm sàng, thay vì chỉ ước lượng hiệu ứng trong từng

cụm cá thể. Trong bối cảnh phôi học, đây là một điểm mạnh đáng kể của phương pháp, bởi nhiều nghiên cứu trước đây đã phân tích ở mức phôi nhưng bỏ qua cấu trúc cụm dữ liệu, dữ liệu quan sát không độc lập, dẫn đến nguy cơ đánh giá quá cao độ chính xác mô hình. Vì vậy, thiết kế của chúng tôi có độ tin cậy nội tại cao hơn so với các nghiên cứu không hiệu chỉnh hiệu ứng cụm dữ liệu (cluster effect) trong các phân tích thống kê lâm sàng hiện nay. Điểm mạnh nữa ở nghiên cứu của chúng tôi là đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân tương đối đồng nhất về tuổi bệnh nhân, chỉ số BMI, độ dày niêm mạc tử cung, không có các bệnh lý tử cung và vòi tử cung đi kèm. Như vậy, ảnh hưởng gây nhiễu từ yếu tố nội mạc tử cung đến kết quả làm tổ đã được giảm đi, tránh gây sai lệch cho kết quả. Phôi bị thoái hóa và giảm chất lượng sau khi rã đông cũng ảnh hưởng đến kết quả làm tổ ở những chu kỳ chuyển phôi đông lạnh. Trong nghiên cứu chúng tôi chỉ sử dụng dữ liệu phân tích từ những trường hợp phôi giữ nguyên chất lượng sau rã đông so với trước khi trữ lạnh, nhằm giảm thiểu tác động gây nhiễu tới kết quả phân tích. Đồng thời nghiên cứu cũng không bao gồm các tiêu chuẩn loại trừ liên quan tới đặc điểm khác như phác đồ kích thích buồng trứng, nguyên nhân vô sinh hay số lượng noãn thu được nhằm mục đích mở rộng phạm vi ứng dụng của mô hình tiên lượng trên các đối tượng bệnh nhân IVF khác nhau.

Chiến lược lựa chọn biến đưa vào mô hình đa biến trong nghiên cứu dựa trên sự kết hợp giữa những biến có ý nghĩa thống kê trong mô hình đơn biến và ý nghĩa sinh học lâm sàng. Điều này phù hợp với khuyến cáo trong phát triển mô hình tiên lượng đa biến, trong đó nhấn mạnh rằng lựa chọn biến không nên chỉ dựa vào ngưỡng giá trị p (p value) mà cần cân nhắc cơ sở lý thuyết và vai trò gây nhiễu tiềm tàng [89]. Việc kiểm tra đa cộng tuyến bằng hệ số phóng đại phương sai (VIF) và hệ số dung sai (tolerance) cũng giúp đảm bảo tính ổn định của mô hình, vì đa cộng tuyến có thể làm sai lệch ước lượng hệ số và giảm khả năng diễn giải lâm sàng [155].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng nhiều mô hình song song trong cùng một quần thể và so sánh hiệu năng phân biệt giữa các cặp mô hình được thực hiện thông qua chênh lệch AUC (ΔAUC). Do một bệnh nhân có thể đóng góp nhiều chu kỳ chuyển phôi, phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) được sử dụng để tính toán khoảng tin cậy 95% của chênh lệch AUC, bảo đảm duy trì cấu trúc phụ thuộc giữa các chu kỳ của cùng một bệnh nhân. Cách tiếp cận này làm giảm sai lệch do khác biệt quần thể nghiên cứu hoặc quy trình phòng Lab IVF giữa các nghiên cứu khác nhau. Phương pháp bootstrap phân cụm theo bệnh nhân (cluster bootstrap) là phương pháp chuẩn để so sánh hai đường cong ROC có tương quan, đặc biệt phù hợp khi các mô hình được xây dựng trên cùng tập dữ liệu [91]. Việc chứng minh mô hình tích hợp có AUC cao hơn có ý nghĩa so với mô hình

đơn lẻ làm tăng giá trị khoa học của kết luận, thay vì chỉ dựa vào sự khác biệt tuyệt đối nhỏ về AUC [91]. Thay vì xây dựng trực tiếp một mô hình đa biến tích hợp tất cả yếu tố, nghiên cứu này của chúng tôi đã đánh giá độc lập từng nhóm biến (hình thái học, EEVA, động học), sau đó xây dựng các mô hình kết hợp để xác định giá trị bổ sung của từng nhóm chỉ số. Cách tiếp cận này giúp làm rõ vai trò độc lập và tính bổ sung giữa các yếu tố tiên lượng, hạn chế nguy cơ đưa các biến không có giá trị thực sự vào mô hình cuối cùng.

Một hạn chế phổ biến trong các nghiên cứu tiên lượng trong lĩnh vực IVF là chỉ báo cáo AUC mà không đánh giá độ phù hợp của mô hình (calibration). Ngoài khả năng phân biệt (discrimination) thông qua AUC, nghiên cứu còn đánh giá độ phù hợp mô hình (calibration) và tiến hành nội kiểm bootstrap 1000 lần. Việc thực hiện bootstrap để đánh giá độ lạc quan (optimism) là bước quan trọng nhằm giảm nguy cơ quá khớp (overfitting), một vấn đề thường gặp trong các nghiên cứu xây dựng mô hình với số biến tương đối nhiều so với số biến cố. Bootstrap nội kiểm được xem là phương pháp hiệu quả và thực tiễn nhất để đánh giá độ ổn định mô hình khi chưa có dữ liệu xác thực ngoại bộ [93]. Giá trị đánh giá độ lạc quan (optimism) thấp chứng tỏ mô hình ít bị quá khớp (overfitting) và có khả năng duy trì hiệu năng trên mẫu tương tự. Điều này nâng cao tính giá trị nội tại đáng kể trong bối cảnh nghiên cứu lâm sàng hiện nay. Nghiên cứu của chúng tôi không chỉ dừng lại ở đánh giá khả năng phân biệt (discrimination) mà còn phân tích hiệu chuẩn bằng biểu đồ calibration (Hình **3.6**) và các chỉ số định lượng (MAE, MSE, calibration slope, 90th percentile absolute error). Đây là điểm mạnh quan trọng về mặt phương pháp luận. Trong các nghiên cứu tiên lượng lâm sàng, chỉ số AUC thường được báo cáo phổ biến, tuy nhiên AUC không phản ánh mức độ chính xác của xác suất dự đoán. Việc bổ sung đánh giá calibration giúp khẳng định rằng mô hình không chỉ phân biệt tốt mà còn dự đoán xác suất sát với thực tế, đánh giá độ ổn định của mô hình, điều này đặc biệt quan trọng trong bối cảnh hỗ trợ quyết định chuyển phôi.

Mô hình logistic cho phép đồng thời 2 ứng dụng: (1) Suy luận thống kê về liên hệ giữa các biến độc lập trong mô hình với xác suất khả năng làm tổ; và (2) Sử dụng như một mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi chuyển. Trong nghiên cứu này, mô hình tiên lượng khả năng làm tổ được xây dựng dựa trên hồi quy logistic đa biến nhằm xác định các yếu tố liên quan độc lập và ước tính xác suất làm tổ cho từng cá thể. Hồi quy logistic cho phép điều chỉnh đồng thời nhiều biến nhiễu và lượng hóa mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố thông qua tỉ số chênh - OR từ đó xây dựng phương trình dự đoán xác suất dựa trên tổ hợp các đặc điểm lâm sàng và phôi học. Tuy nhiên, mặc dù có nền tảng thống kê vững chắc, việc áp dụng trực tiếp phương trình hồi quy

trong thực hành lâm sàng còn nhiều hạn chế do tính phức tạp của công thức toán học và sự thiếu trực quan khi diễn giải hệ số hồi quy. Các giá trị OR khó chuyển đổi thành thông tin cụ thể để tư vấn bệnh nhân, đặc biệt trong bối cảnh hỗ trợ sinh sản, nơi quyết định chuyển phôi cần được cá thể hóa và đưa ra nhanh chóng. Việc chuyển mô hình hồi quy sang dạng biểu đồ nomogram (Hình **3.7**) trong nghiên cứu này nhằm khắc phục những hạn chế trên bằng cách chuyển các hệ số hồi quy thành hệ thống thang điểm trực quan, cho phép tính tổng điểm và quy đổi thành xác suất dự đoán cụ thể cho từng phôi. Điều này thể hiện tính ứng dụng thực hành lâm sàng của nghiên cứu, giúp bác sĩ lâm sàng ước tính xác suất làm tổ một cách cá thể hóa mà không cần tính toán phức tạp hỗ trợ quá trình tư vấn cũng như ra quyết định lâm sàng. Quan trọng hơn, nomogram được xây dựng từ mô hình đã qua nội kiểm và đánh giá hiệu chuẩn, do đó có cơ sở khoa học vững chắc thay vì chỉ mang tính minh họa.

Tuy nhiên, thiết kế nghiên cứu vẫn tồn tại một số hạn chế cần được xem xét. Thứ nhất, tại Việt Nam, trung tâm của chúng tôi là trung tâm duy nhất sử dụng phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA, do đó nghiên cứu được thực hiện tại một trung tâm đơn lẻ, dẫn đến tính khái quát (generalizability) có thể bị hạn chế. Các đặc điểm của quần thể bệnh nhân, quy trình kích thích buồng trứng, kỹ thuật nuôi cấy phôi, cũng như tiêu chuẩn đánh giá và lựa chọn phôi có thể mang tính đặc thù của trung tâm nghiên cứu. Do đó, mô hình được xây dựng có thể phản ánh tốt dữ liệu nội bộ nhưng chưa chắc đã duy trì hiệu năng tương tự khi áp dụng trên các quần thể bệnh nhân khác hoặc tại các trung tâm hỗ trợ sinh sản khác với đặc điểm thực hành lâm sàng khác nhau. Các khuyến cáo quốc tế về nghiên cứu tiên lượng đều nhấn mạnh tầm quan trọng của xác thực ngoại kiểm trước khi áp dụng rộng rãi mô hình tiên lượng [89]. Thứ hai, trong nghiên cứu hiện tại, quần thể nghiên cứu có độ tuổi tương đối trẻ và mức độ phân bố tuổi không quá rộng. Do đó, mặc dù tuổi mẹ đã được xem xét trong phân tích, ảnh hưởng của tuổi có thể không biểu hiện rõ trong quần thể nghiên cứu này. Việc không ghi nhận mối liên quan có ý nghĩa thống kê không đồng nghĩa với việc tuổi không có ảnh hưởng đến khả năng làm tổ, mà có thể một phần do đặc điểm và sự hạn chế về biến thiên tuổi của quần thể nghiên cứu. Bên cạnh đó, số noãn thu được trung bình tương đối cao có thể liên quan đến thực hành bố trí hệ thống nuôi cấy time-lapse tại Trung tâm nhằm tối ưu hóa công suất sử dụng. Đặc điểm này có thể ảnh hưởng đến tính đại diện của mẫu và khả năng khái quát hóa kết quả, đặc biệt đối với nhóm bệnh nhân có số noãn thu được thấp. Đây là những hạn chế cần lưu ý khi áp dụng kết quả nghiên cứu cho các nhóm phụ nữ lớn tuổi hoặc có đáp ứng buồng trứng kém. Dù đã hiệu chỉnh các yếu tố chính như tuổi mẹ và chất lượng phôi, vẫn có thể tồn tại nhiễu còn sót từ các yếu tố không đo lường được như mức độ tiếp

nhận nội mạc tử cung hoặc bất thường di truyền của phôi. Thứ ba, nghiên cứu được thiết kế theo hướng hồi cứu, do đó tồn tại một số hạn chế cần được xem xét khi diễn giải kết quả. Thiết kế hồi cứu phụ thuộc vào dữ liệu sẵn có trong hồ sơ bệnh án và hệ thống quản lý dữ liệu, vì vậy có thể tiềm ẩn nguy cơ thiếu hụt hoặc sai lệch thông tin, đặc biệt đối với các biến liên quan đến đặc điểm lâm sàng và điều kiện nuôi cấy phôi. Bên cạnh đó, dữ liệu được thu thập trong giai đoạn từ tháng 03/2020 đến tháng 12/2023, trong khi thực hành lâm sàng và phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản có thể thay đổi theo thời gian, bao gồm quy trình nuôi cấy phôi, điều kiện vận hành hệ thống nuôi cấy time-lapse, phương pháp đánh giá hình thái và tiêu chí lựa chọn phôi chuyển. Những thay đổi này có thể tạo ra sự không đồng nhất giữa các giai đoạn thu thập số liệu và ảnh hưởng đến khả năng duy trì hiệu năng của mô hình khi áp dụng trong các điều kiện thực hành khác. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của các thay đổi theo thời gian chưa được đánh giá đầy đủ trong nghiên cứu này. Ngoài ra, thiết kế hồi cứu không cho phép kiểm soát hoàn toàn các yếu tố gây nhiễu tiềm ẩn, do đó có thể ảnh hưởng đến mức độ chính xác của mô hình dự đoán, mặc dù tiêu chí chọn mẫu rõ ràng đã góp phần hạn chế vấn đề này ở mức độ nhất định.

Tổng thể, thiết kế nghiên cứu đáp ứng tương đối đầy đủ các tiêu chuẩn phương pháp luận trong xây dựng mô hình tiên lượng lâm sàng hiện đại. Việc hiệu chỉnh cấu trúc cụm bằng GEE, kiểm soát đa cộng tuyến, so sánh mô hình và nội kiểm bootstrap đã nâng cao độ tin cậy nội tại của kết quả. Nghiên cứu đáp ứng tương đối đầy đủ các khuyến nghị hiện đại trong xây dựng mô hình tiên lượng lâm sàng: lựa chọn biến có cơ sở sinh học ý nghĩa lâm sàng và thống kê, so sánh mô hình từng bước, đánh giá đồng thời khả năng phân biệt (discrimination) và độ phù hợp (calibration), nội kiểm bằng bootstrap, và chuyển đổi sang công cụ ứng dụng lâm sàng dưới dạng biểu đồ nomogram [89,150,152]. Cách tiếp cận này góp phần nâng cao độ tin cậy khoa học và tính thực tiễn của mô hình tiên lượng làm tổ sau chuyển đơn phôi nang. Mặc dù cần xác thực ngoại kiểm để củng cố tính khái quát hóa, hiệu quả áp dụng mô hình ngoài trung tâm, thiết kế nghiên cứu hiện tại có nền tảng phương pháp vững chắc và phù hợp với xu hướng quốc tế trong xây dựng mô hình dự báo trong hỗ trợ sinh sản.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong thời gian thực hiện đề tài từ tháng 5 năm 2023 đến tháng 12 năm 2025, đề tài đã thu thập dữ liệu hồi cứu của 2522 phôi nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang (ngày 5 hoặc 6) từ 291 chu kỳ chọc hút noãn giai đoạn từ tháng 3 năm 2020 đến tháng 12 năm 2023 để phân tích kết quả phôi nang. Trong cùng giai đoạn, đề tài cũng đã thu thập 511 phôi nang được chuyển trong 511 chu kỳ chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông thỏa mãn tiêu chuẩn được đưa vào phân tích kết quả thai kỳ và xây dựng mô hình làm tổ. Trên cơ sở đó, đề tài rút ra một số kết luận chính như sau:

1. Giá trị của phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA trong tiên lượng kết quả nuôi cấy và kết quả có thai

- Phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA có giá trị tiên lượng đối với khả năng phát triển thành phôi nang và chất lượng hình thái phôi nang. Điểm EEVA càng cao thì tỷ lệ hình thành phôi nang càng giảm, đồng thời nguy cơ phôi nang có chất lượng hình thái kém càng tăng.
- EEVA có mối liên quan với khả năng làm tổ của phôi nang trong chu kỳ chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông. Điểm EEVA cao liên quan đến xác suất làm tổ thấp hơn. Việc kết hợp EEVA với đánh giá hình thái truyền thống cải thiện khả năng tiên lượng kết quả có thai so với sử dụng riêng lẻ từng phương pháp.

2. Xây dựng và đánh giá mô hình tiên lượng khả năng làm tổ của phôi nang đông lạnh

- Nghiên cứu đã khảo sát giá trị tiên lượng của phần mềm EEVA, đánh giá hình thái truyền thống và các thông số động học giai đoạn phôi nang. Đồng thời xây dựng các mô hình tiên lượng dựa trên từng phương pháp riêng lẻ và các mô hình kết hợp. Sau quá trình lựa chọn biến, mô hình tối ưu là mô hình kết hợp điểm EEVA và đánh giá hình thái truyền thống.
- Mô hình tiên lượng được xây dựng trên dữ liệu bệnh nhân Việt Nam chuyển đơn phôi nang đông lạnh - rã đông, kết hợp phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA với hệ thống đánh giá hình thái theo đồng thuận quốc tế hiện hành. Mô hình có khả năng tiên lượng tốt với diện tích dưới đường cong ROC sau hiệu chỉnh bootstrap đạt 0,72.
- Hiệu năng của mô hình được đánh giá toàn diện thông qua khả năng phân biệt (discrimination), độ phù hợp (calibration) và nội kiểm bằng phương pháp bootstrap 1000 lần. Mô hình duy trì tính ổn định và độ tin cậy sau hiệu chỉnh

nội bộ, đồng thời được xây dựng thành nomogram, tạo cơ sở cho việc hỗ trợ lựa chọn phôi và tư vấn chiến lược chuyển đơn phôi trong thực hành lâm sàng.

KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi kiến nghị các ứng dụng và hướng nghiên cứu tiếp theo như sau:

1. Mô hình lựa chọn phôi kết hợp giữa phần mềm đánh giá phôi tự động EEVA và đánh giá hình thái có khả năng dự đoán tỷ lệ làm tổ cao và ổn định, có thể áp dụng trong lựa chọn phôi chuyển.
2. Để có thể áp dụng rộng rãi mô hình tại các trung tâm khác, cần có nghiên cứu xác thực ngoại kiểm với dữ liệu tại trung tâm đó trước khi đưa vào áp dụng.
3. Cần tiếp tục nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và thời gian theo dõi dài hơn nhằm đánh giá thêm các kết cục lâm sàng quan trọng như tỷ lệ sinh sống, kết cục chu sinh, qua đó hoàn thiện hơn các mô hình tiên lượng trong hỗ trợ sinh sản.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Bài báo khoa học:

1. **Hop, V. D.**, Cuong, A. M., Anh, P. T., Huong, N. T., Hoang, L., & Hanh, N. V. (2024). Clinical validation of the early embryo viability assessment system: Analysis for the blastocyst morphology and pregnancy outcomes. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *13*(5), 219-227.
2. **Hop, V. D.**, Cuong, A. M., Anh, P. T. T., Huong, N. T. L., Hoang, L., & Van Hanh, N. (2025). Correlation between human embryo morphokinetics and pregnancy outcomes on Asian infertility women: A retrospective cohort study. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, *14*(3), 140-142.
3. **Vu, D. H.**, Phi, T. T. A., An, M. C., Nguyen, T. M. T., Nguyen, T. L. H., Le, H., & Nguyen, V. H. (2025). Prediction of pregnancy outcomes of single vitrified-warmed blastocyst transfer using a combination of the Early Embryo Viability Assessment and morphological assessment. *Vietnam Journal of Biotechnology*, *23*(3), 275-295.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zargar, M., Dehdashti, S., Najafian, M., Choghakabodi, P.M., 2021, Pregnancy outcomes following in vitro fertilization using fresh or frozen embryo transfer, *JBRA Assisted Reproduction*, 25(4), pp. 570–574.

2. The Working Group on the update of the ESHRE/ALPHA Istanbul Consensus, Coticchio, G., Ahlström, A., Arroyo, G., Balaban, B., Campbell, A., De Los Santos, M.J., Ebner, T., Gardner, D.K., Kovačič, B., Lundin, K., Magli, M.C., Mcheik, S., Morbeck, D.E., Rienzi, L., Sfontouris, I., Vermeulen, N., Alikani, M., 2025, The Istanbul consensus update: a revised ESHRE/ALPHA consensus on oocyte and embryo static and dynamic morphological assessment, *Human Reproduction*, 40(6), pp. 989–1035.

3. Zhang, J.Q., Li, X.L., Peng, Y., Guo, X., Heng, B.C., Tong, G.Q., 2010, Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate, *Reproductive Biomedicine Online*, 20(4), pp. 510–515.

4. ESHRE Working group on Time-lapse technology, Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., Marques, M., Meseguer, M., Montjean, D., Sfontouris, I., Sturmey, R., Coticchio, G., 2020, Good practice recommendations for the use of time-lapse technology, *Human Reproduction Open*, 2020(2), hoaa008.

5. Dung, P., Pham, Q.T., Tran, T.L., Vuong, L.N., Tuong, H.M., 2021, Blastocyst Prediction of Day-3 Cleavage-Stage Embryos Using Machine Learning, *Fertility & Reproduction*, 3(4), pp. 150–155.

6. De Gheselle, S., Jacques, C., Chambost, J., Blank, C., Declerck, K., De Croo, I., Hickman, C., Tilleman, K., 2022, Machine learning for prediction of euploidy in human embryos: in search of the best-performing model and predictive features, *Fertility and Sterility*, 117(4), pp. 738–746.

7. Reignier, A., Girard, J.M., Lammers, J., Chtourou, S., Lefebvre, T., Barriere, P., Freour, T., 2019, Performance of Day 5 KIDScore^{TM} morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(11), pp. 2279–2285.

8. Ueno, S., Berntsen, J., Ito, M., Okimura, T., Kato, K., 2022, Correlation between an annotation-free embryo scoring system based on deep learning and live birth/neonatal outcomes after single vitrified-warmed blastocyst transfer: a single-

centre, large-cohort retrospective study, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(9), pp. 2089–2099.

9. Valera, M.A., Aparicio-Ruiz, B., Pérez-Albalá, S., Romany, L., Remohí, J., Meseguer, M., 2023, Clinical validation of an automatic classification algorithm applied on cleavage stage embryos: analysis for blastulation, euploidy, implantation, and live-birth potential, *Human Reproduction*, 38(6), pp. 1060–1075.

10. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K.M., Ramsing, N.B., Remohí, J., 2011, The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation, *Human Reproduction*, 26(10), pp. 2658–2671.

11. Petersen, B.M., Boel, M., Montag, M., Gardner, D.K., 2016, Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3, *Human Reproduction*, 31(10), pp. 2231–2244.

12. Carrasco, B., Arroyo, G., Gil, Y., Gómez, M.J., Rodríguez, I., Barri, P.N., Veiga, A., Boada, M., 2017, Selecting embryos with the highest implantation potential using data mining and decision tree based on classical embryo morphology and morphokinetics, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(8), pp. 983–990.

13. Barrie, A., Homburg, R., McDowell, G., Brown, J., Kingsland, C., Troup, S., 2017, Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms, *Fertility and Sterility*, 107(3), pp. 613–621.

14. Adamson, G.D., Abusief, M.E., Palao, L., Witmer, J., Palao, L.M., Gvakharia, M., 2016, Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection, *Fertility and Sterility*, 105(2), pp. 369–375.e6.

15. Shioya, M., Kobayashi, T., Sugiura, T., Fujita, M., Takahashi, K., 2022, The morphokinetics algorithm based on data from day 5 blastocyst transfer (KIDScoreD5 version 3) is also useful for embryo selection in day 6 blastocyst transfer, *Reproductive Medicine and Biology*, 21(1), e12484.

16. Cetinkaya, C. P., Kahraman, S., 2016, Morphokinetics of embryos—where are we now?, *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility*, 5, pp. 1–8.

17. My N.T.T., Thụy N.H.M., Quang L.N., Minh V.B.H., Tai P.V., Bình T.T.T., 2021, *Xây dựng mô hình tiên lượng khả năng làm tổ dựa vào thông số động học của phôi giai đoạn phân chia: nghiên cứu tại IVFAS*, HOSREM Clinical embryology conference.

18. Anh P.T.T., Hương N.T.L., Hợp V.Đ., Phượng Đ.T.T., Mạnh L.V., 2023, Ảnh hưởng của thông số động học phôi giai đoạn phân chia tới khả năng làm tổ của phôi nang rã đông, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 529(1).

19. Debec, A., Sullivan, W., Bettencourt-Dias, M., 2010, Centrioles: active players or passengers during mitosis?, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(13), pp. 2173–2194.

20. Magli, M.C., Jones, G.M., Lundin, K., van den Abbeel, E., 2012, Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. Preface, *Human Reproduction*, 27 (Suppl 1), i1 des229.

21. Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, G.J., Mack, C., Scott, R.T., 1999, Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation, *Fertility and Sterility*, 71(5), pp. 836–842.

22. De Cássia Savio Figueira, R., Souza Setti, A., Paes De Almeida Ferreira Braga, D., Iaconelli, A., Borges, E., 2010, Blastomere multinucleation: Contributing factors and effects on embryo development and clinical outcome, *Human Fertility*, 13(3), pp. 143–150.

23. Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., Lundin, K., 2001, Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation, *Human Reproduction*, 16(2), pp. 313–318.

24. Ivec, M., Kovacic, B., Vlaisavljevic, V., 2011, Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction, *Fertility and Sterility*, 96(6), pp. 1473–1478.e2.

25. Nagy, Z.P., Varghese, A.C., Agarwal, A. (eds.), 2019, *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*, 2nd ed., Springer International Publishing.

26. Hardy, K., Handyside, A.H., Winston, R.M., 1989, The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro, *Development*, 107(3), pp. 597–604.

27. Hirata, K., Goto, S., Izumi, Y., Taguchi, M., Hayashi, A., Fujioka, M., Ishiko, A., Nakanishi, K., Kimura, F., Murakami, T., 2020, Chromosome analysis of blastocysts derived from single pronuclear zygotes by array CGH and clinical outcomes by the transfer of single pronuclear zygotes, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(7), pp. 1645–1652.

28. Destouni, A., Dimitriadou, E., Masset, H., Debrock, S., Melotte, C., Van Den Bogaert, K., Zamani Esteki, M., Ding, J., Voet, T., Denayer, E., Ravel, T.D., Legius, E., Meuleman, C., Peeraer, K., Vermeesch, J.R., 2018, Genome-wide haplotyping embryos developing from 0PN and 1PN zygotes increases transferrable embryos in PGT-M, *Human Reproduction*, 33(12), pp. 2302–2311.

29. Kroener, L.L., Ambartsumyan, G., Pisarska, M.D., Briton-Jones, C., Surrey, M., Hill, D., 2015, Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy, *Fertility and Sterility*, 103(3), pp. 694–698.

30. Wang, J., Diao, Z., Fang, J., Zhu, L., Xu, Z., Lin, F., Zhang, N., Chen, L., 2022, The influence of day 3 embryo cell number on the clinical pregnancy and live birth rates of day 5 single blastocyst transfer from frozen embryo transfer cycles, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 22, 980.

31. Storr, A., 2018, *Morphological selection of embryos and time-lapse technology*, Ph.D. Thesis Medicine and Health, UNSW Sydney.

32. Royen, E.V., Mangelschots, K., Vercruyssen, M., Neubourg, D.D., Valkenburg, M., Ryckaert, G., Gerris, J., 2003, Multinucleation in cleavage stage embryos, *Human Reproduction*, 18(5), pp. 1062–1069.

33. Fabozzi, G., Alteri, A., Rega, E., Starita, M.F., Piscitelli, C., Giannini, P., Colicchia, A., 2016, Morphological assessment on day 4 and its prognostic power in selecting viable embryos for transfer, *Zygote*, 24(4), pp. 477–484.

34. Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999, Culture and transfer of human blastocysts, *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 11(3), pp. 307–311.

35. Sivanantham, S., Saravanan, M., Sharma, N., Shrinivasan, J., Raja, R., 2022, Morphology of inner cell mass: a better predictive biomarker of blastocyst viability, *PeerJ*, 10, e13935.

36. Watson, A.J., Barcroft, L.C., 2001, Regulation of blastocyst formation, *Frontiers in Bioscience*, 6, pp. D708–D730.

37. Takahashi, H., Takahashi, K., Goto, M., Hirakawa, T., Hasegawa, H., Shitara, A., Iwasawa, T., Togashi, K., Makino, K., Shirasawa, H., Miura, H., Sato, W., Kumazawa, Y., Terada, Y., 2021, Consistency between chromosomal status analysis of biopsied human blastocyst trophectoderm cells and whole blastocyst cells, *Reproductive Medicine and Biology*, 20(4), pp. 444–450.

38. ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen, E., Rubio, C., Christopikou, D., Dimitriadou, E., Gontar, J., Goossens, V., Maurer, M., Spinella, F., Vermeulen, N., De Rycke, M., 2020, ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations, *Human Reproduction Open*, 2020(3), hoaa017.

39. Adamyan, L., Pivazyan, L., Obosyan, L., Krylova, E., Isaeva, S., 2024, Preimplantation genetic testing for aneuploidy in patients of different age: a systematic review and meta-analysis, *Obstetrics & Gynecology Science*, 67(4), pp. 356–379.

40. Gardner, D.K., Meseguer, M., Rubio, C., Treff, N.R., 2015, Diagnosis of human preimplantation embryo viability, *Human Reproduction Update*, 21(6), pp. 727–747.

41. Krisher, R.L., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., 2015, Omics as a window to view embryo viability, *Fertility and Sterility*, 103(2), pp. 333–341.

42. VerMilyea, M.D., Tan, L., Anthony, J.T., Conaghan, J., Ivani, K., Gvakharia, M., Boostanfar, R., Baker, V.L., Suraj, V., Chen, A.A., Mainigi, M., Coutifaris, C., Shen, S., 2014, Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study, *Reproductive Biomedicine Online*, 29(6), pp. 729–736.

43. Oh, S.J., Gong, S.P., Lee, S.T., Lee, E.J., Lim, J.M., 2007, Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining

viability of preimplantation embryos in vitro, *Fertility and Sterility*, 88(4 Suppl), pp. 1150–1157.

44. Conaghan, J., Chen, A.A., Willman, S.P., Ivani, K., Chenette, P.E., Boostanfar, R., Baker, V.L., Adamson, G.D., Abusief, M.E., Gvakharia, M., Loewke, K.E., Shen, S., 2013, Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial, *Fertility and Sterility*, 100(2), pp. 412–419.e5.

45. Racowsky, C., Ohno-Machado, L., Kim, J., Biggers, J.D., 2009, Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day?, *Human reproduction*, 24(9), pp. 2014–2113.

46. Sjöblom, P., Menezes, J., Cummins, L., Mathiyalagan, B., Costello, M.F., 2006, Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics, *Fertility and Sterility*, 86(4), pp. 848–861.

47. Balakier, H., Sojecki, A., Motamedi, G., Librach, C., 2016, Impact of multinucleated blastomeres on embryo developmental competence, morphokinetics, and aneuploidy, *Fertility and Sterility*, 106(3), pp. 608–614.e2.

48. Ergin, E.G., Calişkan, E., Yalçinkaya, E., Oztel, Z., Cökelez, K., Ozay, A., Ozörnek, H.M., 2014, Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome, *Fertility and Sterility*, 102(4), pp. 1029–1033.e1.

49. Aguilar, J., Rubio, I., Muñoz, E., Pellicer, A., Meseguer, M., 2016, Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate, *Fertility and Sterility*, 106(2), pp. 291–299.e2.

50. Mizobe, Y., Oya, N., Iwakiri, R., Yoshida, N., Sato, Y., Miyoshi, K., Tokunaga, M., Ezono, Y., 2016, Effects of early cleavage patterns of human embryos on subsequent in vitro development and implantation, *Fertility and Sterility*, 106(2), pp. 348–353.e2.

51. Azzarello, A., Hoest, T., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, A.L., 2016, Live birth rate and number of blastomeres on day 2 transfer, J*ournal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(10), pp. 1337–1342.

52. Dolinko, A. V., Racowsky, C., 2019, Time-lapse microscopy for embryo culture and selection, in *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices*, Springer International Publishing, pp. 227–245.

53. Zaninovic, N., Ye, Z., Zhan, Q., Clarke, R., Rosenwaks, Z., 2013, Cell stage onsets, embryo developmental potential and chromosomal abnormalities in embryos exhibiting direct unequal cleavages (DUCs), *Fertility and Sterility*, 100(3), S242.

54. Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.J., Bellver, J., Meseguer, M., 2012, Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: A time-lapse study, *Fertility and Sterility*, 98(6), pp. 1458–1463.

55. Liu, Y., Chapple, V., Roberts, P., Matson, P., 2014, Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the EmbryoScope time-lapse video system, *Fertility and Sterility*, 102(5), pp. 1295–1300.e2.

56. Balakier, H., Cabaca, O., Bouman, D., Shewchuk, A.B., Laskin, C., Squire, J.A., 2000, Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism, *Human Reproduction*, 15(11), pp. 2404–2410.

57. Almagor, M., Or, Y., Fieldust, S., Shoham, Z., 2015, Irregular cleavage of early preimplantation human embryos: characteristics of patients and pregnancy outcomes, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(12), pp. 1811–1815.

58. Yang, S.T., Shi, J.X., Gong, F., Zhang, S.P., Lu, C.F., Tan, K., Leng, L.Z., Hao, M., He, H., Gu, Y.F., Lu, G.X., Lin, G., 2015, Cleavage pattern predicts developmental potential of day 3 human embryos produced by IVF, *Reproductive Biomedicine Online*, 30(6), pp. 625–634.

59. Malik, A., Patel, P., Ehsan, L., Guleria, S., Hartka, T., Adewole, S., Syed, S., 2021, Ten simple rules for engaging with artificial intelligence in biomedicine, *PLoS Computational Biology*, 17(2), e1008531.

60. Jordan, M.I., Mitchell, T.M., 2015, Machine learning: Trends, perspectives, and prospects, *Science*, 349(6245), pp. 255–260.

61. Chavez-Badiola, A., Flores-Saiffe Farias, A., Mendizabal-Ruiz, G., Garcia-Sanchez, R., Drakeley, A.J., Garcia-Sandoval, J.P., 2020, Predicting pregnancy test results after embryo transfer by image feature extraction and analysis using machine learning, *Scientific Reports*, 10(1), 4394.

62. Miyagi, Y., Habara, T., Hirata, R., and Hayashi, N., 2019, Feasibility of artificial intelligence for predicting live birth without aneuploidy from a blastocyst image, *Reproductive Medicine and Biology*, 18(2), pp. 204–211.

63. VerMilyea, M., Hall, J.M.M., Diakiw, S.M., Johnston, A., Nguyen, T., Perugini, D., Miller, A., Picou, A., Murphy, A.P., Perugini, M., 2020, Development of an artificial intelligence-based assessment model for prediction of embryo viability using static images captured by optical light microscopy during IVF, *Human Reproduction*, 35(4), pp. 770–784.

64. Diamond, M.P., Suraj, V., Behnke, E.J., Yang, X., Angle, M.J., Lambe-Steinmiller, J.C., Watterson, R., Wirka, K.A., Chen, A.A., Shen, S., 2015, Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(1), pp. 61–68.

65. Wong, C., Chen, A.A., Behr, B., Shen, S., 2013, Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research, *Reproductive Biomedicine Online*, 26(2), pp. 120–129.

66. Herbert, S.-L., Staib, C., Wallner, T., Löb, S., Curtaz, C., Schwab, M., Wöckel, A., Häusler, S., 2023, Morphokinetic analysis of early human embryonic development and its relationship to endometriosis resection: a retrospective time-lapse study using the KIDScore™ D3 and D5 implantation data algorithm, *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 308(2), pp. 587–597.

67. Cuevas Saiz, I., Pons Gatell, M.C., Cuadros Vargas, M., Delgado Mendive, A., Rives Enedáguila, N., Moragas Solanes, M., Carrasco Canal, B., Teruel López, J., Busquets Bonet, A., Hurtado de Mendoza Acosta, M.V., 2018, The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts, *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 5(1), pp. 42–54.

68. Motato, Y., Santos, M.J. de los, Escriba, M.J., Ruiz, B.A., Remohí, J., Meseguer, M., 2016, Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system, *Fertility and Sterility*, 105(2), pp. 376–384.e9.

69. Davies, S., Kallioras, N., Tsakalis, P., Christopikou, D., Daskalopoulou, Z., Zaxaria, S., Mastrominas, M., Lagaros, N., 2021, Machine learning-based assessment model as a predictive tool for blastocyst grading utilizing

morphokinetic parameters prior to the third cleavage division, *Fertility and Sterility*, 116(3), pp. e174.

70. Azzarello, A., Hoest, T., Mikkelsen, A.L., 2012, The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture, *Human Reproduction*, 27(9), pp. 2649–2657.

71. Aguilar, J., Motato, Y., Escribá, M.J., Ojeda, M., Muñoz, E., Meseguer, M., 2014, The human first cell cycle: impact on implantation, *Reproductive Biomedicine Online*, 28(4), pp. 475–484.

72. Wirka, K.A., Chen, A.A., Conaghan, J., Ivani, K., Gvakharia, M., Behr, B., Suraj, V., Tan, L., Shen, S., 2014, Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development, *Fertility and Sterility*, 101(6), pp. 1637–1648.e5.

73. Basile, N., Vime, P., Florensa, M., Aparicio Ruiz, B., García Velasco, J.A., Remohí, J., Meseguer, M., 2015, The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection, *Human Reproduction*, 30(2), pp. 276–283.

74. Liu, Y., Chapple, V., Feenan, K., Roberts, P., Matson, P., 2015, Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: a time-lapse study, *Fertility and Sterility*, 103(6), pp. 1485–1491.e1.

75. Goodman, L.R., Goldberg, J., Falcone, T., Austin, C., Desai, N., 2016, Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial, *Fertility and Sterility*, 105(2), pp. 275–285.e10.

76. Yang, L., Cai, S., Zhang, S., Kong, X., Gu, Y., Lu, C., Dai, J., Gong, F., Lu, G., Lin, G., 2018, Single embryo transfer by Day 3 time-lapse selection versus Day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial, *Human Reproduction*, 33(5), pp. 869–876.

77. Fishel, S., Campbell, A., Montgomery, S., Smith, R., Nice, L., Duffy, S., Jenner, L., Berrisford, K., Kellam, R.S., Foad, F., Beccles, A., 2018, Time-lapse imaging algorithms rank human preimplantation embryos according to the probability of live birth, *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3), pp. 304–313.

78. Kovacs, P., Lieman, H.J., 2019, Which embryo selection method should be offered to the patients?, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(4), pp. 603–605.

79. Bori, L., Meseguer, F., Valera, M.A., Galan, A., Remohi, J., Meseguer, M., 2022, The higher the score, the better the clinical outcome: retrospective evaluation of automatic embryo grading as a support tool for embryo selection in IVF laboratories, *Human Reproduction*, 37(6), pp. 1148–1160.

80. Kasius, A., Smit, J.G., Torrance, H.L., Eijkemans, M.J.C., Mol, B.W., Opmeer, B.C., Broekmans, F.J.M., 2014, Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: A systematic review and meta-analysis, *Human Reproduction Update*, 20(4), pp. 530–541.

81. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., Buchner, A., 2007, G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences, *Behavior Research Methods*, 39(2), pp. 175–191.

82. Riley, R.D., Ensor, J., Snell, K.I.E., Harrell, F.E., Martin, G.P., Reitsma, J.B., Moons, K.G.M., Collins, G., van Smeden, M., 2020, Calculating the sample size required for developing a clinical prediction model, *BMJ (Clinical research ed.)*, 368, m441.

83. Korkidakis, A., Au, J., Albert, A., Havelock, J., 2021, Higher blastocyst implantation in frozen versus fresh embryo transfers in good prognosis patients, *Minerva Obstetrics and Gynecology*, 73(6), pp. 776–781.

84. Tartia, A.P., Wu, C.Q., Gale, J., Shmorgun, D., Léveillé, M.C., 2022, Time-lapse KIDScoreD5 for prediction of embryo pregnancy potential in fresh and vitrified-warmed single-embryo transfers, *Reproductive BioMedicine Online*, 45(1), pp. 46–53.

85. Cermisoni, G.C., Taggi, M., Asturi, F., Saturno, G., Casciani, V., Innocenti, F., Soscia, D.M., Alviggi, E., Fiorentino, G., Zuccotti, M., Vaiarelli, A., Ubaldi, F.M., Coticchio, G., Rienzi, L., Cimadomo, D., 2025, Cytoplasmic strings between inner cell mass and trophectoderm: novel predictors of euploid blastocysts' implantation competence, *Human Reproduction*, 40(Suppl 1), deaf097.442.

86. Penzias, A., Bendikson, K., Butts, S., Coutifaris, C., Falcone, T., Fossum, G., Gitlin, S., Gracia, C., Hansen, K., Barbera, A.L., Mersereau, J., Odem, R.,

Paulson, R., Pfeifer, S., Pisarska, M., Rebar, R., Reindollar, R., Rose, M., Sandlow, J., Vernon, M., 2017, Performing the embryo transfer: a guideline, *Fertility and Sterility*, 107(4), pp. 882–896.

87. Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., 1999, In vitro culture of human blastocyst, in *Towards reproductive certainty: Fertility and Genetics Beyond*, Parthenon Publishing, pp. 378–388.

88. Hosmer, D.W., Lemeshow, S., and Sturdivan, R.X., 2013, Assessing the Fit of the Model, in *Applied Logistic Regression*, John Wiley & Son, pp. 153–225.

89. Collins, G.S., Reitsma, J.B., Altman, D.G., Moons, K.G.M., 2015, Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement, *BMJ*, 350, g7594.

90. Collins, G.S., Dhiman, P., Ma, J., Schlussel, M.M., Archer, L., Calster, B.V., Harrell, F.E., Martin, G.P., Moons, K.G.M., van Smeden, M., Sperrin, M., Bullock, G., Riley, R.D., 2024, Evaluation of clinical prediction model (part 1): from development to external validation, *BMJ*, 384, e074819.

91. Rutter, C.M., 2000, Bootstrap estimation of diagnostic accuracy with patient-clustered data, *Academic Radiology*, 7(6), pp. 413–419.

92. Ying, G.-S., Maguire, M.G., Glynn, R.J., Rosner, B., 2021, Tutorial on Biostatistics: Receiver-Operating Characteristic (ROC) Analysis for Correlated Eye Data, *Ophthalmic Epidemiology*, 29(2), pp. 117–127.

93. Steyerberg, E.W., 2019, Study Design for Prediction Modeling, in C*linical Prediction Models: A Practical Approach to Development, Validation, and Updating*, Springer International Publishing, pp. 37–58.

94. Harrell, F.E., Lee, K.L., Mark, D.B., 1996, Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors, *Statistics in Medicine*, 15(4), pp. 361–387.

95. Velde, E.R. te, Pearson, P.L., 2002, The variability of female reproductive ageing, *Human Reproduction Update*, 8(2), pp. 141–154.

96. Rittenberg, V., Seshadri, S., Sunkara, S.K., Sobaleva, S., Oteng-Ntim, E., El-Toukhy, T., 2011, Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis, *Reproductive Biomedicine Online*, 23(4), pp. 421–439.

97. Sunkara, S.K., Rittenberg, V., Raine-Fenning, N., Bhattacharya, S., Zamora, J., Coomarasamy, A., 2011, Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles, *Human Reproduction*, 26(7), pp. 1768–1774.

98. Vaiarelli, A., Zacà, C., Spadoni, V., Cimadomo, D., Conforti, A., Alviggi, C., Palermo, R., Bulletti, C., De Santis, L., Pisaturo, V., Vigiliano, V., Scaravelli, G., Ubaldi, F.M., Borini, A., 2023, Clinical and laboratory key performance indicators in IVF: A consensus between the Italian Society of Fertility and Sterility and Reproductive Medicine (SIFES-MR) and the Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR), *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(6), pp. 1479–1494.

99. Liu, X., Zhao, J., Zhang, Y., Nie, Z., Li, Q., Guo, L., Fan, C., Zhang, J., Zhang, N., 2024, Development and validation of a clinical prediction model for blastocyst formation during IVF/ICSI-ET, *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1432943.

100. Franasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R., Scott, R.T., 2014, The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening, *Fertility and Sterility*, 101(3), pp. 656–663.e1.

101. Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F.M., Rienzi, L., 2018, Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence, *Frontiers in Endocrinology*, 9, 327.

102. Hamzaoglu, F.K., Dilbaz, S., Ozelci, R., Kaya, O., Ozen, E.U., 2025, AMH as a Predictor of Follicle Turnover, Embryo Quality, and Pregnancy Outcomes: A Retrospective Analysis, *Biomedicines*, 13(12), 2875.

103. Liao, Z., Liu, C., Cai, L., Shen, L., Sui, C., Zhang, H., Qian, K., 2022, The Effect of Endometrial Thickness on Pregnancy, Maternal, and Perinatal Outcomes of Women in Fresh Cycles After IVF/ICSI: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Frontiers in Endocrinology*, 12, 814648.

104. Zou, H., Kemper, J.M., Hammond, E.R., Xu, F., Liu, G., Xue, L., Bai, X., Liao, H., Xue, S., Zhao, S., Xia, L., Scott, J., Chapple, V., Afnan, M., Morbeck, D.E., Mol, B.W.J., Liu, Y., Wang, R., 2023, Blastocyst quality and reproductive and

perinatal outcomes: a multinational multicentre observational study, *Human Reproduction*, 38(12), pp. 2391–2399.

105. Li, Z., Fang, X., Cheng, L., Ou, Z., Huo, J., Yu, W., Li, J., Ke, W., Wu, J., Lin, X., Wen, X., 2025, Evaluation of day 5 versus day 6 blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing: clinical and neonatal outcomes, *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1544009.

106. Isa, I.S., Yusof, U.K., Zain, M.M., 2023, Image Processing Approach for Grading IVF Blastocyst: A State-of-the-Art Review and Future Perspective of Deep Learning-Based Models, *Applied Sciences*, 13(2), 1195.

107. Thompson, S.M., Onwubalili, N., Brown, K., Jindal, S.K., McGovern, P.G., 2013, Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(12), pp. 1577–1581.

108. Zhao, J., Yan, Y., Huang, X., Sun, L., Li, Y., 2019, Blastocoele expansion: an important parameter for predicting clinical success pregnancy after frozen-warmed blastocysts transfer, *Reproductive Biology and Endocrinology,* 17(1), 15.

109. Ai, J., Jin, L., Zheng, Y., Yang, P., Huang, B., Dong, X., 2021, The Morphology of Inner Cell Mass Is the Strongest Predictor of Live Birth After a Frozen-Thawed Single Embryo Transfer, *Frontiers in Endocrinology*, 12, 621221.

110. Montalvo Palles, V., Munuera, A., Gamez, C., Garcia, F., Garcia-Faura, A., Marques, B., 2025, Quantitative Trophectoderm Cell Assessment as a Predictor of Implantation and Live Birth Rates, *Human Reproduction*, 40(Suppl 1), deaf097.418.

111. Bartolacci, A., Girolamo, S. de, Narduche, L.S., Rabellotti, E., Santis, L.D., Papaleo, E., Pagliardini, L., 2024, Trophectoderm, Inner Cell Mass, and Expansion Status for Live Birth Prediction After Frozen Blastocyst Transfer: The Winner Is Trophectoderm, *Life*, 14(11), 1360.

112. Chen, L., Ji, Y., Zhu, L., Lin, F., Fang, J., Wang, J., Wang, S., 2025, Elective single blastocyst transfer can achieve acceptable clinical pregnancy and live birth rates compared with elective double cleavage-stage embryo transfer in fresh cycles, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 25(1), 685.

113. Chen, S., Du, H., Liu, J., Liu, H., Li, L., He, Y., 2020, Live birth rate and neonatal outcomes of different quantities and qualities of frozen transferred blastocyst in patients requiring whole embryo freezing stratified by age, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 20, 655.

114. Hop, V.D., Cuong, A.M., Anh, P.T.T., Huong, N.T.L., Hoang, L., Hanh, N.V., 2024, Clinical validation of the early embryo viability assessment system: Analysis for the blastocyst morphology and pregnancy outcomes, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 13(5), pp. 219–227.

115. Tan, C., Wang, X., Zou, P., Wei, W., Yan, L., Wang, K., Yu, Y., 2024, Impact of blastocyst grading and blastocyst biopsy dates on the clinical outcomes of patients undergoing preimplantation genetic testing, *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1427922.

116. Højsgaard, S., Halekoh, U., Yan, J., 2006, The R Package geepack for Generalized Estimating Equations, *Journal of Statistical Software*, 15(2), pp. 1–11.

117. Basile, N., Aparicio-Ruiz, B., Velasco, J.G., Santos, M. de los, Gimenez, J.R., Meseguer, M., 2016, Blastocyst formation rate can be predicted by an automatic system independently of the number of oocytes retrieved and the morphology of the embryos on day 3, *Fertility and Sterility*, 106(3), pp. e356.

118. Bartolacci, A., Canto, M.D., Guglielmo, M.C., Mura, L., Brigante, C., Renzini, M.M., Buratini, J., 2021, Early embryo morphokinetics is a better predictor of post-ICSI live birth than embryo morphology: speed is more important than beauty at the cleavage stage, *Zygote*, 29(6), pp. 495–502.

119. Aparicio-Ruiz, B., Basile, N., Pérez Albalá, S., Bronet, F., Remohí, J., Meseguer, M., 2016, Automatic time-lapse instrument is superior to single-point morphology observation for selecting viable embryos: retrospective study in oocyte donation, *Fertility and Sterility*, 106(6), pp. 1379–1385.e10.

120. Giménez, C., Conversa, L., Murria, L., Meseguer, M., 2023, Time-lapse imaging: Morphokinetic analysis of in vitro fertilization outcomes, *Fertility and Sterility*, 120(2), pp. 218–227.

121. Yang, S.-H., Wu, C.-H., Chen, Y.-C., Yang, C.-K., Wu, T.-H., Chen, P.-C., Tsai, H.-D., 2018, Effect of morphokinetics and morphological dynamics of cleavage stage on embryo developmental potential: A time-lapse study, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 57(1), pp. 76–82.

122. Bian, Y., Zhao, S.H., Shramuk, M.E., Schauer, J.M., Riley, J., Komorowski, A., Bernardi, L., 2025, Inner Cell Mass Grade and Earlier Blastulation Are Associated with Pregnancy Outcomes in Euploid Embryos, *Reproductive Sciences*, 32(10), pp. 3410–3418.

123. Jiang, R., Yang, G., Wang, H., Fang, J., Hu, J., Zhang, T., Kong, Y., Wu, Z., Huang, X., Qi, L., Song, N., Song, W., Jin, H., Yao, G., 2024, Exploring key embryonic developmental morphokinetic parameters that affect clinical outcomes during the PGT cycle using time-lapse monitoring systems, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 24, 870.

124. Storr, A., Venetis, C.A., Cooke, S., Susetio, D., Kilani, S., Ledger, W., 2015, Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(7), pp. 1151–1160.

125. Si, K., Ma, B., Bai, J., Wu, L., He, H., Jin, L., Huang, B., 2024, Preimplantation development analysis of aneuploid embryos with different chromosomal abnormalities, *Heliyon*, 10(23), e40686.

126. Broer, S.L., Broekmans, F.J.M., Laven, J.S.E., Fauser, B.C.J.M., 2014, Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications, *Human Reproduction Update*, 20(5), pp. 688–701.

127. Tal, R., Tal, O., Seifer, B.J., Seifer, D.B., 2015, Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis, *Fertility and Sterility*, 103(1), pp. 119–130.e3.

128. Hsu, A., Arny, M., Knee, A.B., Bell, C., Cook, E., Novak, A.L., Grow, D.R., 2011, Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance, *Fertility and Sterility*, 95(2), pp. 474–479.

129. Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., Schoolcraft, W.B., 2000, Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer, *Fertility and Sterility*, 73(6), pp. 1155–1158.

130. Shi, W., Jin, L., Liu, J., Zhang, C., Mi, Y., Shi, J., Wang, H., Liang, X., 2021, Blastocyst morphology is associated with the incidence of monozygotic twinning in assisted reproductive technology, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 225(6), pp. 654.e1–654.e16.

131. Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N., Sánchez-García, J.F., Colls, P., Wells, D., 2011, The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy, *Molecular Human Reproduction*, 17(5), pp. 286–295.

132. Ahlström, A., Westin, C., Reismer, E., Wikland, M., Hardarson, T., 2011, Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer, *Human Reproduction*, 26(12), pp. 3289–3296.

133. Chen, X., Zhang, J., Wu, X., Cao, S., Zhou, L., Wang, Y., Chen, X., Lu, J., Zhao, C., Chen, M., Ling, X., 2014, Trophectoderm morphology predicts outcomes of pregnancy in vitrified-warmed single-blastocyst transfer cycle in a Chinese population, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(11), pp. 1475–1481.

134. Hill, M.J., Richter, K.S., Heitmann, R.J., Graham, J.R., Tucker, M.J., DeCherney, A.H., Browne, P.E., Levens, E.D., 2013, Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers, *Fertility and Sterility*, 99(5), pp. 1283–1289.e1.

135. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011, The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Human Reproduction*, 26(6), pp. 1270–1283.

136. Zhao, Q., Dasig, J., Watt, J., Shu, Y., Gebhardt, J., Behr, B., 2009, Impact of blastocyst expansion at time of cryopreservation on implantation rate, *Fertility and Sterility*, 92(3), pp. S249–S250.

137. Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., Reijo Pera, R.A., 2010, Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage, *Nature Biotechnology*, 28(10), pp. 1115–1121.

138. Kirkegaard, K., Ahlström, A., Ingerslev, H.J., Hardarson, T., 2015, Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology, *Fertility and Sterility*, 103(2), pp. 323–332.

139. Soukhov, E., Karavani, G., Szaingurten-Solodkin, I., Alfayumi-Zeadna, S., Elharar, G., Richter, D., Wainstock, T., Zeadna, A., Levitas, E., Har-Vardi, I., 2022, Prediction of embryo implantation rate using a sole parameter of timing of starting blastulation, *Zygote*, 30(4), pp. 501–508.

140. Mumusoglu, S., Ozbek, I.Y., Sokmensuer, L.K., Polat, M., Bozdag, G., Papanikolaou, E., Yarali, H., 2017, Duration of blastulation may be associated with ongoing pregnancy rate in single euploid blastocyst transfer cycles, *Reproductive BioMedicine Online*, 35(6), pp. 633–639.

141. Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L.R., Austin, C., Goldberg, J., Falcone, T., 2014, Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 54.

142. Bellolio, M.F., Serrano, L.A., Stead, L.G., 2008, Understanding statistical tests in the medical literature: which test should I use?, *International Journal of Emergency Medicine*, 1(3), pp. 197–199.

143. Warne, R.T., 2020, Regression, in *Statistics for the Social Sciences: A General Linear Model Approach*, 2nd ed., Cambridge University Press, pp. 369–402.

144. Boateng, E.Y., Abaye, D.A., 2019, A Review of the Logistic Regression Model with Emphasis on Medical Research, *Journal of Data Analysis and Information Processing*, 7(4), pp. 190–207.

145. Guo, N., Deng, T., Jiang, H., Gong, Y., Yin, L., Ren, X., Jin, L., Li, Y., 2020, Association between blastocyst morphology and live birth rate following frozen-thawed single blastocyst transfer: Results from a 5-year retrospective analysis of 2593 cryopreserved blastocysts, *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 46(11), pp. 2314–2322.

146. Hochler, H., Lipschuetz, M., Suissa-Cohen, Y., Weiss, A., Sela, H.Y., Yagel, S., Rosenbloom, J.I., Grisaru-Granovsky, S., Rottenstreich, M., 2023, The Impact of Advanced Maternal Age on Pregnancy Outcomes: A Retrospective Multicenter Study, *Journal of Clinical Medicine*, 12(17), 5696.

147. Bourdon, M., Pocate-Cheriet, K., Finet de Bantel, A., Grzegorczyk-Martin, V., Amar Hoffet, A., Arbo, E., Poulain, M., Santulli, P., 2019, Day 5 versus Day 6 blastocyst transfers: a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes, *Human Reproduction*, 34(10), pp. 1948–1964.

148. Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Hickman, C.F.L., 2013, Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics, *Reproductive Biomedicine Online*, 26(5), pp. 477–485.

149. Armstrong, S., Bhide, P., Jordan, V., Pacey, A., Marjoribanks, J., Farquhar, C., 2019, Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(5), CD011320.

150. Harrell, F.E., 2015, Multivariable Modeling Strategies, in *Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic and Ordinal Regression, and Survival Analysis*, 2nd ed., Springer International Publishing, pp. 63–102.

151. Li, F., Lu, R., Zeng, C., Li, X., Xue, Q., 2021, Development and Validation of a Clinical Pregnancy Failure Prediction Model for Poor Ovarian Responders During IVF/ICSI, *Frontiers in Endocrinology*, 12, 717288.

152. Liu, L., Gan, Q., Yang, Y., Liu, B., Huang, Q., Li, M., 2024, A predictive model for clinical pregnancy following single Day-6 blastocyst transfer in frozen-thawed embryo transfer cycles, *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1428086.

153. Mina, A., Younesi, M., Doohandeh, T., Darzi, S., Ardehjani, N.A., Sheibani, S., Hosseinirad, H., Valizadeh, R., 2025, Predicting pregnancy outcomes in IVF cycles: a systematic review and diagnostic meta-analysis of artificial intelligence in embryo assessment, *Contraception and Reproductive Medicine*, 10(1), 59.

154. Rogers, P., Stoner, J., 2015, Modification of the Sandwich Estimator in Generalized Estimating Equations with Correlated Binary Outcomes in Rare Event and Small Sample Settings, *American Journal of Applied Mathematics and Statistics*, 3(6), pp. 243–251.

155. Hosmer, D. W., Lemeshow, S., Sturdivant, R.X., 2013, Application of Logistic Regression with Different Sampling Models, in *Applied Logistic Regression*, John Wiley & Son, Inc., pp. 227–242.